

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

**“MECANISMOS DE REGULACIÓN DE C-FLIP_L Y C-FLIP_S POR DEPRIVACIÓN
DE SUERO EN CÉLULAS TUMORALES. IMPLICACIÓN EN LA APOPTOSIS
MEDIADA POR FAS”.**

Memoria de Tesis Doctoral presentada para optar al grado de Doctor por la Licenciada en
Bioquímica

M^a DEL PILAR LOPEZ RODRIGUEZ

Directora
Dra Susana Alemany de la Peña
Científico Titular del C.S.I.C.
Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”
C.S.I.C.-UAM

Madrid 2007

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

**“MECANISMOS DE REGULACIÓN DE C-FLIP_L Y C-FLIP_S POR DEPRIVACIÓN
DE SUERO EN CÉLULAS TUMORALES. IMPLICACIÓN EN LA APOPTOSIS
MEDIADA POR FAS”.**

M^a DEL PILAR LOPEZ RODRIGUEZ

Madrid 2007

Dra. Susana Alemany de la Peña, Investigador Científico Titular del C.S.I.C. en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

CERTIFICA:

Que M^a del Pilar López Rodríguez, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral titulada “**Mecanismos de regulación de c-FLIP_L y c-FLIP_S por privación de suero en células tumorales. Implicación en la apoptosis mediada por Fas**”.

Considero que tanto el trabajo experimental realizado como las conclusiones del mismo reúnen las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Y para que conste y efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a 12 de noviembre de 2007.

Fdo: Dra Susana Alemany de la Peña
Directora de la Tesis Doctoral
Científico Titular del C.S.I.C
Instituto de Investigaciones Biomédicas
“Alberto Sols”. UAM-C.S.I.C.

Fdo: Dra Margarita Fernandez
Tutor de la Tesis Doctoral
Profesor Titular
Dpto. Bioquímica
Facultad de Medicina UAM

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas“Alberto Sols”, U.A.M.-C.S.I.C. gracias a una beca pre-doctoral concedida durante 4 años consecutivos por el Ministerio de Educación y Ciencia.

Tened paciencia y tendréis ciencia

Baltasar Gracián

A mis padres

A mi hermana

A Rubén

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En el tiempo que me ha llevado elaborar esta Tesis Doctoral han pasado muchas personas que, de un modo u otro, han colaborado para que fuera capaz de conseguirla. MUCHAS GRACIAS .

Ante todo agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Susana Alemany; la confianza que depositó en mí para llevar adelante el trabajo desde que llegué a su laboratorio, aún sin terminar la carrera. Durante todo este tiempo en su laboratorio, cerca de 6 años, he aprendido mucho; ese aprendizaje no solo me ha permitido lograr los ansiados resultados que forman esta Tesis sino también poder hacer lo que realmente me gusta y para lo que estudié en la carrera. Muchas gracias Susana.

También quiero agradecer de forma muy especial a mi tutora la Dra. Margarita Fernández toda la ayuda que me ha prestado. Con su paciencia y sus buenas manos me ha solucionado muchos de mis problemas de “cacharreo”, además ha demostrado sus buenas dotes como profesora explicándome y haciéndome entender muchas de las dudas que me han ido surgiendo. Gracias también por la gran ayuda que me ha prestado en la última etapa de la tesis.

En las reuniones que hemos mantenido las tres, Susana, Marga y yo, me han enseñado cómo se maneja la ciencia o viceversa. Ha sido un placer y una suerte poder trabajar con las dos.

A la hora de enfrentarme al manejo de técnicas y al trabajo en el laboratorio han sido muchas las manos que me han tendido. De manera muy especial agradezco la ayuda que me brindó Ana Velasco en mis comienzos, que son difíciles para todos. Gracias por explicarme de forma tan minuciosa las técnicas y protocolos, y sobre todo gracias por sacarme de los apuros que se sufren cuando se es novata. Gracias también a las chicas que junto a Ana formaban las originales “niñas del B-15”: Rosa y Marisa. Rosa, con la que coincidí muy poco tiempo, fue muy amable conmigo, que se agradece mucho cuando se llega. Fue ella la que me cedió su sitio y su color, por ello aunque parezca mentira la tengo un aprecio especial. Marisa a la que pillé en su última fase (que como ahora entiendo, es la más estresante y tensa), puso a mi disposición su experiencia y también su simpatía. Me alegro de seguir teniendo contacto con todas ellas.

También en los primeros años en el B-15 coincidí con Cristina y Blanca. Eran estupendas en su trabajo como técnicos y aún más como compañeras. Gracias por todo el trabajo y tiempo del que me habéis liberado, gracias además por los buenos momentos que me hicisteis pasar. Un poquito de esta tesis también es vuestro.

Mientras que el resto de las compañeras iban abandonando el laboratorio; Cristina ha compartido conmigo desde el principio todos estos años. Formamos un buen equipo; entre sus martes y jueves de inglés y mis madrugones podíamos con todo. Mucha suerte en tu aventura post-doctoral.

Otras compañeras que han pasado y han dado “ambientillo” al labo con su simpatía han sido Mayte, la única post-doctoral que hemos tenido y Elvira. Fue muy fácil trabajar con ellas. Y Ramón, el único chico del B-15, al que fue un placer enseñar. Muchas gracias Ramón por los momentos tan divertidos que nos hiciste pasar; Ah! y perdón por no dejarte parar ni un momento y hacer que tu “piscolabis” llegara siempre tarde. La ciencia es así.

A la última generación del B-15: Irene, un torbellino de energía y alegría, y Marta que como yo ha empezado en el labo siendo estudiante. Irene, me hubiera gustado mucho haber coincidido contigo más tiempo, eres una gran compañera. Muchas gracias por tus ánimos, en esta última etapa se necesitan. Marta, un buen relevo, mucha suerte. Mucha suerte a las dos.

Agradezco también la ayuda que me han prestado el resto de los laboratorios del pasillo (B-11 - B19). En especial al B-13; muchas gracias al Dr. J. Castaño que siempre ha solucionado las dudas que le he planteado. Y gracias también a todas las chicas y al chico que han pasado por el B-13: Bea, Ana, Virginia, Begoña, Marta, Ana y Fernando por ser no solo buenos compañeros del laboratorio de al lado, sino también buenos amigos fuera de él. Muchas gracias por todo.

A mi gran amiga Vanessa que desde el B-11 ha compartido toda mi etapa pre-doctoral: Muchas gracias. Gracias por las charlillas en el pasillo y los viajes en el metro. Siempre desahogarse es bueno y contigo es muy fácil. Mucha suerte Vane y ánimo que tú puedes con todo.

Gracias también a Pilar Ochoa, la mejor técnico del lugar, por solucionar todas mis dudas experimentales y por tus consejos. Te deseo lo mejor, de todo corazón.

A Manoli, gracias por los buenos días de todas las mañanas y por las conversaciones entre barreño y barreño. También a Raquel, de esterilización, gracias por pasar por alto nuestros despistes y acercarnos las cestas que dejamos olvidadas.

Y a mis compañeras de comedor: María Galardi, María Pacheco y María Valencia. Gracias por el ratito de desconexión de todos los días. Me lo he pasado muy bien con vosotras. Os echaré de menos.

Casi seis años dan para mucho, espero no haber pasado por alto a nadie.

A mi amiga Elena Maganto que desde que nos hicimos Bioquímica juntas hemos compartido muchos momentos, casi todos buenos aunque alguno malo; pero para eso estamos las amigas, ¿verdad?. Siempre he admirado tu capacidad y tu tesón; ya lo he conseguido Elena. Gracias por tus consejos. Espero que tengas mucha suerte en este mundillo, te lo mereces.

De manera muy especial doy las gracias a mi familia. Por circunstancias de la vida, sin el esfuerzo de mi madre y también el de mi hermana no hubiera podido llegar a ser lo que soy hoy. Esta Tesis es también de ellas que me han animado y han confiado en mí desde el principio. Papá, ya se puede decir que soy doctora. Lo hemos conseguido.

Y por último doy las gracias a Rubén, muchas gracias por acompañarme siempre. Gracias por aguantar todas mis fases emocionales, no siempre fáciles de soportar, que he sufrido durante el desarrollo de esta Tesis. Gracias chiqui.

INDICE

ABREVIATURAS	15
RESUMEN/SUMMARY	18
INTRODUCCION	21
1- APOPTOSIS	22
1.2 Apoptosis en organismos superiores	22
1.1 Cambios morfológicos y bioquímicos asociados a apoptosis	23
1.2.1. Fase efectora	23
1.2.2. Fase de ejecución	23
2- MOLECULAS IMPLICADAS EN APOPTOSIS Y SU REGULACION	24
2.1 CASPASAS: iniciadores y ejecutores de la apoptosis	24
2.1.1. Activación de las caspasas	25
2.1.2. Sustratos de las caspasas	27
2.2 PROTEINAS DE LA SUPERFAMILIA BCL-2	28
2.2.1. Miembros pro-apoptóticos	28
2.2.2. Miembros anti-apoptóticos	29
3- VIAS DE SEÑALIZACION A APOPTOSIS	30
3.1 VIA INTRINSECA	30
3.2 VIA EXTRINSECA	31
4 MOLECULAS REGULADORAS DE LAS DIFERENTES VIAS APOPTOTICAS	33
4.1 IAPs	33
4.2 c-FLIP	34
5 VIAS DE SUPERVIVENCIA	36
5.1 VIA DE LA PI3K/Akt	36
5.2 VIA DE LAS MAPK	37
5.3 VIA DE LA JNK	38
5.4 VIA DE LA p38	39
5.5 VIA DE LAS JAK/STATs	39
OBJETIVOS	41

MATERIALES Y METODOS	43
1 MATERIALES	44
1.1 Anticuerpos	45
1.2 Cultivos celulares	45
1.2 Transfección celular	45
1.3 Estímulos	45
1.4 Ciclo celular	45
1.5 Medida de concentración de proteínas	45
1.6 Otro material utilizado	46
1.7 Tampones y soluciones	46
2 METODOS	47
2.1 Cultivos celulares	47
2.2 Construcciones	48
2.3 Transfección con fosfato cálcico	49
2.4 Estimulación celular	50
2.5 Citometría de flujo	51
2.5.1 Análisis de la apoptosis celular	51
2.5.2 Análisis de expresión en superficie de Fas	51
2.6 Preparación de lisados e inmunodetección en membrana de PVDF (Western blot)	52
RESULTADOS	53
1 La privación de suero sensibiliza las células HeLa a la apoptosis inducida por Fas	54
2 La privación de suero produce una disminución en los niveles de pAkt, pERK 1/2 y c-FLIP _S	57
3 La actividad Akt protege a las células HeLa de apoptosis	59
4 Papel de caspasa-8 y c-FLIP en la apoptosis inducida por Fas o LY en células HeLa	64
5 Clasificación de las células HeLa como tipo II en la muerte mediada por Fas	67
6 El ayuno de suero y el tratamiento con LY sensibilizan a apoptosis mediada por Fas a células BxPc3 pero no a células AsPC1	68
7 En células HeLa c-FLIP _S es el principal freno en la activación de caspasa-8 mientras que en las células BxPC3 el bloqueo lo ejerce c-FLIP _L	72

DISCUSION	76
------------------------	----

CONCLUSIONES	87
---------------------------	----

BIBLIOGRAFIA	89
---------------------------	----

ANEXO	97
--------------------	----

- **. Artículo derivado de esta tesis Doctoral:**

“Mechanisms involved in the regulation of c-FLIP_L and c-FLIP_S by serum starvation in tumour cells. Implication in Fas-induced apoptosis” Pilar López, et al. 2007. Enviado a publicar a la revista Cellular Signaling..... 99-129

- **. Artículos publicados sobre otros proyectos realizados en el laboratorio en el que la doctoranda ha colaborado:**

“The COOH-Terminal Domain of Wild-Type Cot Regulates Its stability and Kinase Specific Activity”. Maria Luisa Gándara, Pilar López, et al. Molecular and cellular Biology. Oct. 2003. p 7377-7390.....130-143

“Cot/tpl-2 influences the invasive potencial of transformed cells”. Cristina Rodríguez, Pilar López, et al. Enviado a la revista: J. Cell. Mol. Med.....144-163

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AIF:	Factor inductor de apoptotitis
Akt/PKB:	Proteína quinasa B
ASK-1:	Quinasa reguladora de la señal apoptotica-1
ANT:	Transportador del nucleótido adenina
BH:	Homólogo a Bcl-2
BIR:	Repetición IAP en Baculovirus
CAD:	Dexorribonucleasa activada por caspasas
CARD:	Dominio de reclutamiento de caspasas
CED:	Muerte celular
DAXX:	Proteína asociada a muerte
DD:	Dominio de muerte
DED:	Dominio efector de muerte
DIABLO:	Proteína inhibidora directa mediante unión aIAP con bajo pI
DISC:	Complejo señalizador de muerte inducida
ERK:	Quinasa regulada por señales extracelulares
FADD:	Dominio de muerte asociado a Fas
FLICE:	FADD semejante a ICE
c-FLIP:	Proteína celular inhibidora de FLICE
HtrA2:	Serín-proteas-2 inducible por choque térmico Heat shock-induced serine
IAP:	Inhibidor de proteínas apoptóticas
ICE:	Enzima convertidora de Interleuquina-1 β
IK-B:	Inhibidor de NF- κ B
IKK:	I κ -B quinasa
ILK:	Quinasa unida a integrina
JAK:	Quinasa Janus activada
JNK:	Quinasa N-terminal c-jun
LY:	LY294002, Inhibidor de PI3K
MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógeno
NF- κB:	Factor nuclear - κ B
PAK:	Quinasa activada p21
PARP:	Poli-(ADP Ribosa)-Polimerasa
PDK:	Quinasa fosfoinosítido dependiente

PH:	Holmología a Pleckstrina
PI3K:	Fosfoinosítido 3 Quinasa
PIDD:	Protina p53-inducida con dominio de muerte
PIP3:	Fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato
PTEN:	Homólogo a fosfatasa y tensina suprimido en el cromosoma 10
PTP:	Poros de transición de la permeabilidad
RAIDD:	Proteína homóloga a ICH-1/CED-3 con dominio de muerte asociada a RIP
RING:	Nuevo gen realmente interesante
RIP-1:	Proteína quinasa interaccionando con el receptor
ROCK-1:	Quinasa asociada a Rho-1
RSK:	Quinasa p90 Ribosomal S6
SAPK:	Proteína quinasa activada por estrés
SD:	Desviación estándar
SMAC:	Segundo activador de caspasas proveniente de mitocondria
STAT:	Proteínas transductores de señal y activadores de transcripción
TNF:	Factor de necrosis tumoral
UO:	UO126, Inhibidor de MEK
VDAC:	Canal aniónico dependiente de voltaje
XAFI:	Factor-I asociado a XIAP
XIAP:	IAP unido a cromosoma-X

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

La estimulación del receptor Fas mediante su ligando o anticuerpos agonísticos (CH11) lleva a la activación de caspasa-8 que a su vez es capaz de activar caspasas ejecutoras y promover apoptosis. Muchas líneas celulares son resistentes a la apoptosis inducida por Fas; el conocimiento de los mecanismos por los que adquieren esa resistencia puede llegar a permitir el desarrollo de tratamientos anti-tumorales. En este trabajo mostramos los mecanismos moleculares implicados en la resistencia a apoptosis inducida por Fas de la línea celular de carcinoma cervical humano HeLa y de las líneas de adenocarcinoma pancreático humano BxPC3 y AsPC1 así como su sensibilización a apoptosis por privación de suero. En células HeLa, la privación de suero promueve varios eventos que sensibilizan a apoptosis inducida por la estimulación de Fas: disminución de los niveles de pAkt y disminución de los niveles de c-FLIP_S, que es el mayor freno para la activación de caspasa-8 en estas células. La disminución de c-FLIP_S promovida por la inhibición parcial de pAkt en células ayunadas de suero, sensibiliza a apoptosis inducida por la estimulación con CH11. La inhibición completa de Akt mediante el tratamiento con LY además, induce también apoptosis por un mecanismo diferente al utilizado por Fas. En las células BxPC3 los niveles de c-FLIP_S son indetectables siendo c-FLIP_L el principal freno en la activación de caspasa-8. La disminución de los niveles de c-FLIP_L tanto en células BxPC3 como en células HeLa, se produce mediante el tratamiento conjunto de CH11 y LY o de CH11 y CHX. Si la estimulación se realiza únicamente con CH11 la disminución de c-FLIP_L solo se observa en ausencia de suero. En todas estas condiciones la disminución de los niveles de c-FLIP_L se corresponde con la activación de caspasa-8 y caspasa-9 y de apoptosis. En las células BxPC3, a diferencia de las células HeLa, el bloqueo de la actividad Akt mediante el tratamiento con LY no promueve apoptosis, solamente sensibiliza a la apoptosis inducida por Fas. En las células AsPC1 la inhibición total de Akt promueve una reducción parcial de c-FLIP_S pero no induce ni sensibiliza a apoptosis. Solo el tratamiento con CH11 junto con CHX promueve una bajada de c-FLIP_S hasta niveles indetectables que se corresponde con la activación de caspasa-8 y caspasa-9. A pesar de la activación de las caspasas las células AsPC1 no mueren por apoptosis. Todos estos datos muestran que distintas líneas celulares resistentes a apoptosis inducida por Fas requieren de diferentes tratamientos para la inducción de apoptosis siendo el ayuno de suero, modulando distintos eventos, una buena herramienta para sensibilizar a muerte por apoptosis.

SUMMARY

Stimulation of Fas with FasL or agonistic antibodies (CH11) triggers caspase-8 activation that leads lastly to executory caspases activation and apoptosis. Many cancer cell lines remain resistant to Fas-mediated apoptosis; the knowledge of the mechanisms involved in this resistance would be useful to develop drugs for cancer therapy. In this study, we show the molecular mechanisms involved in the resistance of the cervical cancer line HeLa and the human cancer pancreatic cell line BxPC3 to apoptosis and its sensitization to Fas-induced apoptosis by serum withdrawal. In the case of HeLa cells, serum deprivation causes several events that promoted Fas-induced apoptosis: down regulation of pAkt levels and c-FLIP_S levels, the major brake for caspase-8 activation in these cells. The decrease of the c-FLIP_S levels which it is promoted by the partial inhibition of pAkt levels that occur in serum deprived cells, sensitize to CH11 induced-apoptosis. The complete inhibition of Akt by the LY treatment also induces apoptosis although through different mechanisms that the ones promoted by Fas. In the BxPC3 cells c-FLIP_S levels are undetectable and c-FLIP_L is the major brake for caspase-8 activation. Down regulation of c-FLIP_L in both HeLa and BxPC3 cells can be achieved by the cooperation of Fas engagement with CH11 together with LY or with cycloheximide treatment. When the cells are treated solely with CH11, c-FLIP_L down regulation is only observed in the serum starvation condition. In all these conditions the c-FLIP_L down regulation corresponds with both caspase-8 and caspase-9 activation and apoptosis. In BxPC3 cells, in contrast with HeLa cells, the blockage of Akt activity through LY treatment does not promote apoptosis but sensitizes to Fas-induced apoptosis. In AsPC1 cells the total inhibition of Akt promotes partial c-FLIP_S down regulation but neither induces nor sensitizes to apoptosis. Only CH11 treatment with CHX promotes the down regulation of c-FLIP_S to low enough levels to allow both caspase-8 and caspase-9 activation. Although, caspases activation occurs AsPC1 cells does not die by apoptosis. All these data show that different cell lines resistant to Fas-induced apoptosis required different treatment to induced apoptosis being serum starvation, by modulating different events, a good tool to induce apoptosis.

INTRODUCCION

1 APOPTOSIS

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico fundamental, mediante el que las células mueren. Fue descrita por primera vez en 1972 por Kerr JF et al, usando como material biológico el nemátodo *C. elegans* (Kerr, 1972) en el que la cisteín-proteasa CED-3 (CELL Death) es la responsable de promover apoptosis. La proteína CED-4 funciona como plataforma de activación de CED-3. Este proceso está regulado negativamente por CED-9 que a su vez es regulada por la proteína EGL-1 (Yuan, 1993).

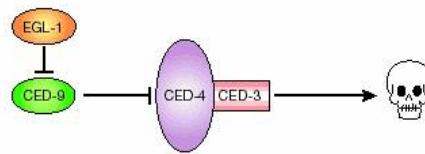


Fig.1. Regulación de la apoptosis en *C. elegans*

Posteriormente se han clonado e identificado genes con funciones similares en células de organismos superiores indicando la universalidad del proceso.

1.1 Apoptosis en organismos superiores

La apoptosis juega un papel esencial tanto en procesos fisiológicos (modelación de estructuras en el desarrollo embrionario, mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos (Thompson, 1995), eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo, etc) como en patológicos (cáncer, desórdenes autoinmunes (Mahoney, 2005), infección viral (Hardwick, 2001), enfermedades neurodegenerativas (Kermer, 2004), etc).

A diferencia de la necrosis, muerte accidental inducida por agresión mecánica o tóxica en la que el contenido celular sale al espacio intercelular provocando inflamación; la apoptosis es una muerte controlada en la que se mantiene intacta la membrana celular, permitiendo su eliminación por fagocitosis sin producir inflamación.

1.1 Cambios morfológicos y bioquímicos asociados a apoptosis

Durante el proceso de apoptosis las células sufren cambios morfológicos y bioquímicos característicos de manera muy ordenada pudiéndose diferenciar varias fases.

1.2.1 Fase efectora:

En esta fase se adopta sin retorno el compromiso hacia la muerte. Se produce un aumento de Ca^{2+} intracelular que promueve la activación de ciertos grupos enzimáticos (endonucleasas y proteasas- caspasas) (Orrenius, 2003). También se dan cambios en el citoesqueleto que producen cambios en el tamaño y forma celular.

1.2.2 Fase de ejecución:

La célula se deforma y pierde el contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. La cromatina se condensa en la periferia nuclear, los nucleolos se desintegran y se reduce el tamaño del núcleo. Los orgánulos citoplasmáticos se condensan y el retículo endoplasmático se dilata. Las mitocondrias se mantienen morfológicamente normales pero pierden el potencial de membrana. Se produce la degradación del DNA genómico mediante la acción de la Topoisomerasa II, que genera fragmentos de 50-100 Kb, y de la endonucleasa CAD que corta el DNA de doble banda intranucleosomal (Nagata, 2003). Los fragmentos oligonucleosomales generados forman la característica escalera de DNA. Por último, el núcleo y el citoplasma se fragmentan formando los denominados “cuerpos apoptóticos”, estructuras rodeadas de membrana plasmática que pierden la asimetría de la membrana y exponen hacia el exterior residuos de fosfatidilserina. Los macrófagos reconocen la fosfatidilserina y fagocitan los cuerpos apoptóticos evitando que su contenido salga al exterior y se produzca inflamación (Kerr, 1994) (Fig. 2).

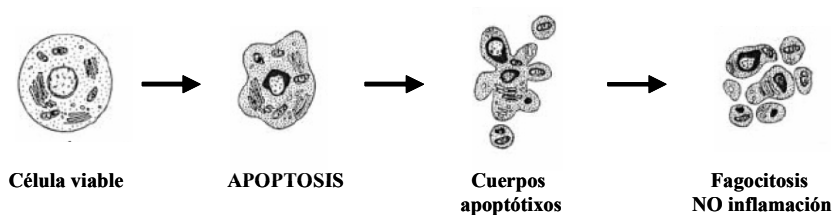


Fig. 2. Cambios experimentados por la célula en el proceso de apoptosis.

2 MOLECULAS IMPLICADAS EN APOPTOSIS Y SU REGULACION

2.1 CASPASAS: iniciadores y ejecutores de la apoptosis.

Las caspasas (cystein-dependent aspartate-specific proteases) son cisteín-proteasas, homólogas a la proteína CED-3 de *C. elegans*, que están implicadas bien en inflamación, activando citoquinas pro-inflamatorias (Tschopp, 2003; Martínón, 2004) o bien en apoptosis. Todas las caspasas son sintetizadas de forma inactiva (zimógenos) denominándose pro-caspasas.

Estructuralmente, las pro-caspasas se componen de un extremo amino terminal de longitud variable y de un dominio catalítico muy conservado que posteriormente se divide en 2 subunidades, una grande de aproximadamente 20 kDa (p20) y una pequeña de aproximadamente 10 kDa (p10) (Chang 2000; Fuentes-Prior, 2004).

En mamíferos se han identificado 14 caspasas clasificadas en tres grupos, dependiendo de la estructura del pro-dominio y de sus funciones (Fan, 2005; Shi, 2002).

- Grupo I: caspasas que contienen pro-dominios grandes e intervienen en inflamación y maduración de citoquinas (caspasa-1, -4, -5, -11, -12, -13 y -14).
- Grupo II: caspasas con pro-dominios cortos (20-30 amino ácidos) denominadas **efectoras** (caspasa-3, -6 y -7) que se encuentran inactivas en forma de dímeros.
- Grupo III: caspasas con pro-dominios grandes (más de 90 amino ácidos) denominadas **iniciadoras** que se encuentran en el citosol como monómeros inactivos (caspasa-2, -8, -9, -10).

Los pro-dominios grandes contienen distintos motivos estructurales como los **DED** (Death Effector Domain), presentes en caspasa-8 y -10, o los **CARD** (Caspase Recruitment Domain) presentes en caspasa-2 y -9 (Ho, 2005). Estos motivos son muy importantes para la activación de las caspasas ya que median interacciones homotípicas con otras proteínas como proteínas adaptadoras u otras caspasas (Lavrik, 2005).

La primera caspasa identificada fue la caspasa-1, implicada en inflamación que se denominó ICE (Interleukin 1 β -Converting Enzyme). Al resto de las caspasas identificadas se las denominó como ICE-like proteasas, un ejemplo es la caspasa-8 que fue denominada FLICE (FADD-like ICE).

2.1.1. Activación de las caspasas

La activación de las caspasas se produce en respuesta a señales específicas y mediante procesos proteolíticos en residuos específicos de ácido aspártico (Asp).

Para la activación se requieren dos procesamientos proteolíticos: el primer corte en el dominio catalítico de la pro-caspasa que genera la subunidad grande (p20) separándola de la pequeña (p10) permitiendo la conformación necesaria para que se forme el centro activo (residuos Arg, His y Cys de la subunidad grande y Arg de la subunidad pequeña); y el segundo corte que separa y libera el pro-dominio amino terminal de la subunidad grande (p20) (Fuentes-Prior 2004; Lavrik, 2005).

La caspasa activa es una estructura cuaternaria formada por dos heterodímeros procedentes del procesamiento de dos pro-caspasas homólogas. En el heterotetrámero formado, las dos subunidades pequeñas quedan adyacentes y rodeadas por las subunidades grandes. La agrupación se da en una configuración cabeza-cola con lo que los dos sitios activos quedan en extremos opuestos de la molécula.

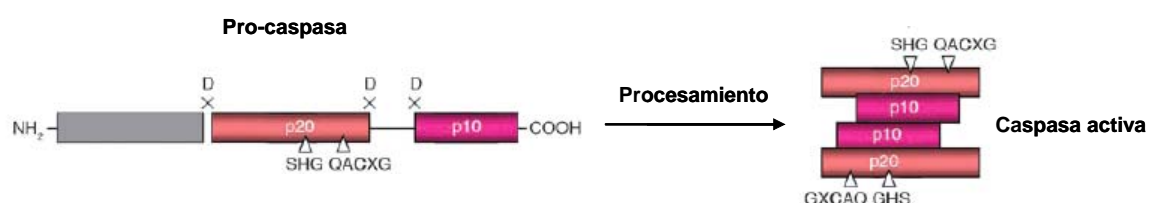


Fig 2. Activación de las caspasas.

Los procesamientos proteolíticos necesarios para la activación de las caspasas pueden llevarse a cabo por otras caspasas, por proteasas como granzima B (Trapani, JA, 2001; Wang, 2005), cathepsina G o calpains (Chua, 2000; Orrenius, 2003), o mediante auto-proteólisis.

La activación de las caspasas efectoras está mediada por las caspasas iniciadoras que cortan tras un residuo interno específico de Asp del dominio catalítico, generando la subunidad grande separándola de la pequeña.

La activación de las caspasas iniciadoras sin embargo se produce mediante auto-proteólisis (Shi, 2002). Su activación dispara la activación de caspasas efectoras que promueven apoptosis, por este motivo es un proceso fuertemente regulado. Para que se produzca se requiere la formación de complejos multiméricos específicos; así la actividad de las caspasas -2, -8 y -9 en células de mamíferos depende del PIDDosoma, del DISC y del apoptosoma respectivamente.

El **PIDDosoma** es un complejo que está formado por PIDD (p53-induced protein with a death domain), la proteína adaptadora RAIDD (RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with Death Domain) y la pro-caspasa-2. Su ensamblaje se produce tras un estrés genotóxico mediante interacciones homotípicas entre los dominios DD (Death Domain) de PIDD y RAIDD e interacciones homotípicas de los dominios CARD de caspasa-2 y RAIDD. Una vez reclutada al PIDDosome la caspasa-2 se activa mediante auto-proteólisis (Bao, 2007; Ho, 2005).

El **DISC** (Death-Inducing Signaling Complex) es un complejo que se origina tras la estimulación de receptores de muerte y que está formado por: el receptor, la proteína adaptadora FADD (Fas-Associated Death Domain) y la pro-caspasa-8. Una vez activados, los receptores de muerte oligomerizan permitiendo la conformación adecuada para que se produzca la interacción homotípica entre los dominios DD presentes en el dominio citosólico de los receptores y en la proteína FADD. En su extremo amino terminal FADD posee además un dominio DED que a su vez interacciona con el dominio DED de la pro-caspasa-8. En el DISC las moléculas de pro-caspasa-8 adquieren la proximidad y la conformación necesaria para su auto-activación (Bao, 2007; Ho, 2005).

El **apoptosoma** es un complejo formado por la agrupación de 7 moléculas de la proteína adaptadora Apaf-1 (Apoptotic protease activation factor-1) que en ausencia de estímulos apoptóticos (estrés citotóxico, choque térmico, estrés oxidativo, daño en el DNA, etc) se encuentra en el citosol como monómero. Para la formación del apoptosoma se requiere la presencia de citocromo-c citosólico, que es liberado de la mitocondria tras la señalización a apoptosis, así como la presencia de ATP/dexosi-ATP ((d)ATP). La unión del citocromo-c a Apaf-1, junto con la hidrólisis de (d)ATP, provoca un cambio de

conformación de Apaf-1 que permite su agrupación formando un heptámero (apoptosoma) dejando accesible sus dominios CARD a los que se unen, mediante interacciones homotípicas, moléculas de pro-caspasa-9 que mediante auto-proteólisis se activan (Ho, 2005; Riedl, 2007; Bao, 2007).

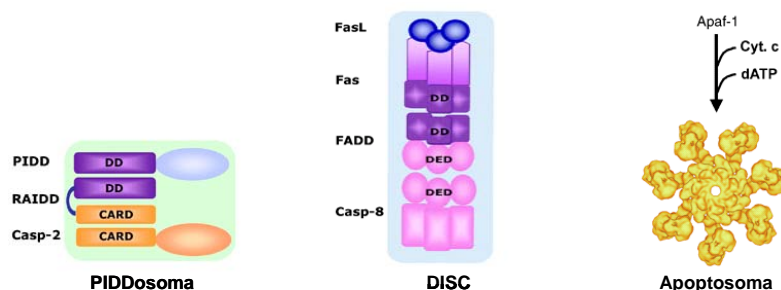


Fig. 3. Complejos para la activación de caspasas iniciadoras.

La activación de las caspasas iniciadoras desencadena mediante la activación de las caspasas efectoras la muerte por apoptosis.

2.1.1 Sustratos de las caspasas

Durante la apoptosis las caspasas proteolizan numerosas proteínas. La proteólisis puede inactivar la proteína proteolizada; o activarla si el corte sucede en un dominio de regulación negativa o en una subunidad inhibidora, promoviendo su degradación.

Dentro de los sustratos de las caspasas efectoras podemos encontrar (para revisión ver Fischer, 2003):

- Componentes del **citoesqueleto nuclear** (lamininas, etc) y **citoplasmático** (vicentina, fodrina, Gas2, etc). Su proteólisis promueve los cambios morfológicos que se manifiestan en la apoptosis.
- Las quinasas **PAK** (p21 Activated Kinase) y **ROCK-1** (Rho-associated Kinase-1) que al ser proteolizadas se activan y promueven el “blebbing” de la membrana.
- Reguladores de la apoptosis como **Bcl-2** y **Bcl-X_L**, miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 que mediante su procesamiento son inactivados.
- **PARP** (Poli-(ADP-Ribosa)-Polimerasa) es una enzima que interviene en la reparación del DNA interaccionando físicamente o añadiendo polímeros de ADP-ribosa a proteínas

implicadas en replicación y transcripción del DNA (la propia PARP, topoisomerasa I y II, DNA polimerasa, histonas y DNA-ligasa-2). La caspasa-3 proteoliza e inactiva PARP impidiendo la reparación del DNA dañado, señalizando para apoptosis.

- **CAD** (Caspase-Activated Deoxyribonuclease). Es una endonucleasa dependiente de Mg^{2+} que participa en la degradación del DNA. Se encuentra en el núcleo formando un complejo con su inhibidor y chaperona: ICAD. La caspasa-3 procesa ICAD dejando CAD libre y activo para degradar el DNA.

2.2 PROTEÍNAS DE LA SUPERFAMILIA BCL-2

Bcl-2 fue descrito inicialmente tras ser aislado de un linfoma en el cual, por translocación cromosómica, quedó bajo el control del promotor de la cadena pesada de las inmunoglobulinas. Su secuenciación lo identificó como homólogo de la proteína anti-apoptótica CED-9 de *C. elegans* (Vaux, 1999). Los 21 miembros descritos de la familia Bcl-2 presentan al menos uno de los cuatro dominios conservados BH (Bcl-2 Homology); además algunos de ellos también posee un dominio transmembrana (TM) (Cory, 2002).

Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis controlando la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Según su efecto regulador inducen o previenen la apoptosis clasificándose en anti- o pro-apoptóticos (Shibue, 2006).

2.2.1 Pro-apoptóticos:

Bax, Bak. Estructuralmente se componen de los dominios BH1, BH2, BH3 pero carecen del BH4, que es donde se sitúa la capacidad anti-apoptótica de esta superfamilia de proteínas. Tras un estímulo apoptótico Bax, que se encuentra en el citosol, se transloca a la membrana mitocondrial donde se encuentra Bak. Se produce entonces la homodimerización de ambas proteínas que promueve cambios conformacionales que inducen la salida del citocromo-c bien formando canales iónicos en la membrana mitocondrial o interaccionando con componentes del PTP (Permeability Transition Pores), como las proteínas VDAC y ANT, provocando su apertura.

Dentro de los miembros pro-apoptóticos se encuentra la subfamilia de las denominadas **proteínas “solo BH3”** (Shibue, 2006) que excepto por el dominio BH3, no muestran homología con Bcl-2. **Bad, Bim, Bik, Bid, Blk, Hrk, Noxa, Bnip3, Puma y Bmf**. Tras la señal de muerte las proteínas “solo BH3” se unen y neutralizan a miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bcl-2 y Bcl-X_L que a su vez se encuentran inhibiendo a Bax y Bak.

Bid participa en la apoptosis inducida por receptores de muerte. Mediante la acción de la caspasa-8 es proteolizado en el citoplasma originando una forma truncada (tBid) que se inserta en la membrana externa mitocondrial promoviendo la homodimerización de Bak y Bax y la salida del citocromo-c de la mitocondria.

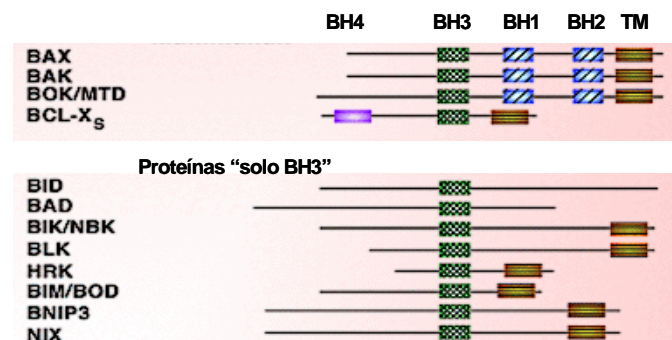


Fig. 4. Miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2.

2.2.2 Anti-apoptóticos:

Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w y Mcl-1. Poseen los cuatro dominios BH además del dominio TM que las orienta hacia el lado citosólico de las membranas del retículo endoplasmático, de la envoltura nuclear y de la membrana externa mitocondrial. Bcl-2 es una proteína integral de membrana mientras que Bcl-X_L y Bcl-w se insertan en la membrana tras una señal citotóxica. Mcl-1 se localiza en la mitocondria y mediante splicing alternativo puede dar lugar a una isoforma pro-apoptótica Mcl-1S (Bae, 2000). La acción anti-apoptótica de estas proteínas la ejercen uniéndose y bloqueando a los miembros pro-apoptóticos (Bax, Bak) evitando la liberación de citocromo-c de la mitocondria.

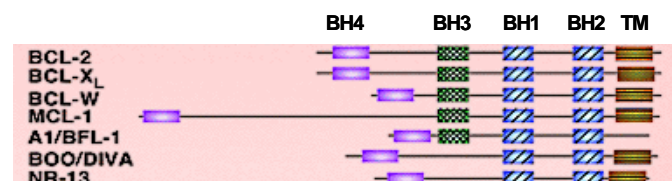


Fig. 3. Miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2.

3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN A APOPTOSIS

Existen dos vías de activación de las caspasas; la intrínseca mediada por estrés celular y la extrínseca mediada por ligandos que se unen a receptores en la superficie celular.

3.1 VIA INTRINSECA

En respuesta a estrés celular (radiaciones ionizantes, drogas, falta de factores de crecimiento, daños en el DNA, etc) se produce la activación de proteínas citosólicas pro-apoptóticas como Bax y Bak que provocan la liberación al citoplasma desde el espacio intermembrana mitocondrial de factores pro-apoptóticos y la pérdida del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$). Entre los factores liberados al citoplasma se encuentran:

- citocromo-c, que se une a Apaf-1 y junto a (d)ATP forma el apoptosoma donde se produce la activación de caspasa-9 (Shi, 2007).

- Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding Protein with low pI), que se une y bloquea a las proteínas IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) impidiendo la inhibición que éstas ejercen sobre las caspasas (Riedl, 2004).

- AIF (Apoptotic Inductor Factor), es una endonucleasa que migra al núcleo y se une al DNA promoviendo su condensación y posterior degradación (Danial, 2004).

Una vez activada, la caspasa-9 puede activar a caspasas efectoras de apoptosis como caspasa-3 y caspasa-7. Se ha descrito que caspasa-3 puede activar caspasa-9 generándose un loop positivo de activación (Fujita, 2001).

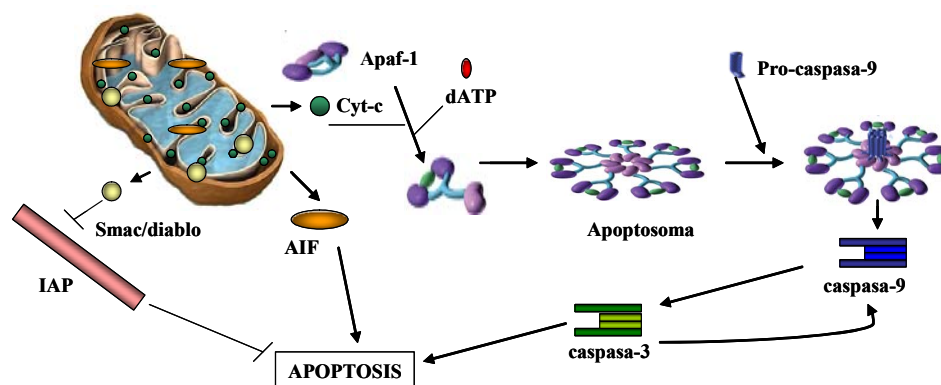


Fig. 4. Vía intrínseca

3.2 VIA EXTRINSECA

Los receptores de muerte (Fas, TNF-R1, TRAIL-R1/R2, DR3, DR6) pertenecen a la superfamilia de receptores de TNF (Tumor Necrosis Factor) que pueden estar implicados en proliferación, diferenciación y apoptosis, dependiendo del contexto celular. Los TNFR son proteínas de membrana ricas en Cys en su región extracelular que además, algunos miembros de esta superfamilia, contienen un dominio de muerte (DD) en su región intracelular (Boatright, 2003). Uno de los receptores TNF más estudiados es Fas; su ligando (FasL) es sintetizado como proteína transmembrana; a partir de esta proteína se puede generar una forma soluble por la acción de metaloproteasas (Schneider, 1998).

Tras la estimulación del receptor de muerte Fas, se promueve la formación del DISC donde es activada la caspasa-8. Los tres componentes esenciales e indispensables del DISC son: Fas, FADD y pro-caspasa-8, aunque también puede contener otros cofactores o proteínas reguladoras como c-FLIP (FLICE-like inhibitory protein).

Una vez formado el DISC se producen dos eventos proteolíticos que van a dar lugar a las subunidades catalíticas p20 y p10. En el primero la pro-caspasa-8 (p55) se auto-proteoliza dando lugar a dos fragmentos, p43/41 y p10, que permanecen unidas al DISC. Para el segundo procesamiento se requiere de otra molécula de pro-caspasa-8 que proteolice la subunidad p43/41 originando la subunidad p26, correspondiente al prodominio amino terminal, y la subunidad p18 que forma un heterodímero con la subunidad p10. El heterodímero formado se une a otro homólogo para formar el tetrámero que corresponde a caspasa-8 activa (Krueger, 2001) y promueve la activación de otras caspasas, entre las que se encuentra la efectora caspasa-3.

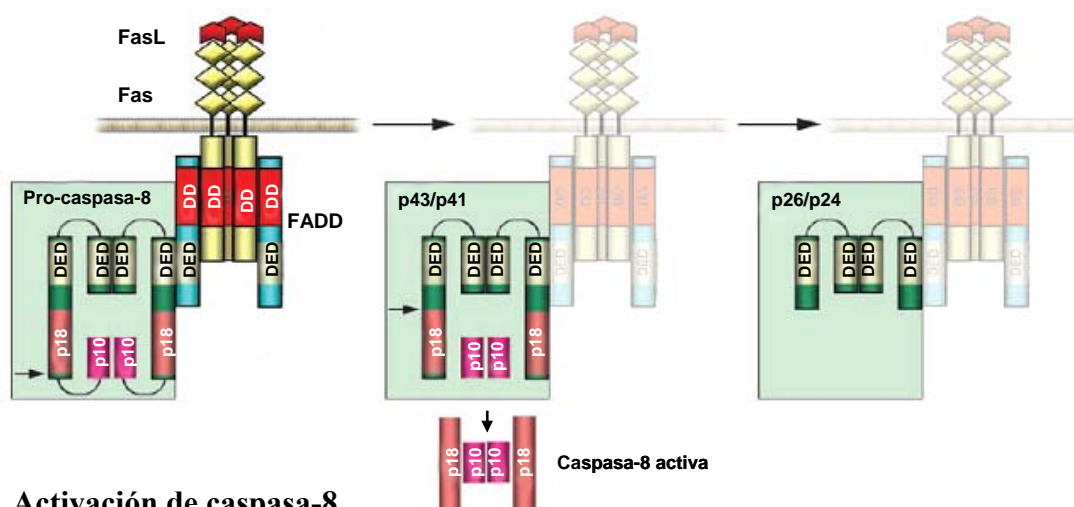


Fig. 5. Activación de caspasa-8

Se han definido dos tipos celulares diferentes en los que la vía extrínseca se lleva a cabo mediante vías de señalización diferentes (Scaffidi, 1998; Tafani, 2006):

- Células tipo I: tras la estimulación del receptor se genera gran cantidad de caspasa-8 activa que es suficiente para activar la caspasa-3 y promover apoptosis.
- Células tipo II: la cantidad de caspasa-8 activada que se genera es reducida y se requiere de la liberación de citocromo-c mitocondrial y la activación de caspasa-9 para inducir apoptosis. La caspasa-8 activa generada, corta a la proteína pro-apoptotica Bid que está en el citoplasma induciendo la salida al citoplasma del citocromo-c. Se forma entonces el apoptosoma y se activa la caspasa-9. Esta vía se puede inhibir por la acción de miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bcl-X_L o Bcl-2 (Scaffidi, 1998).

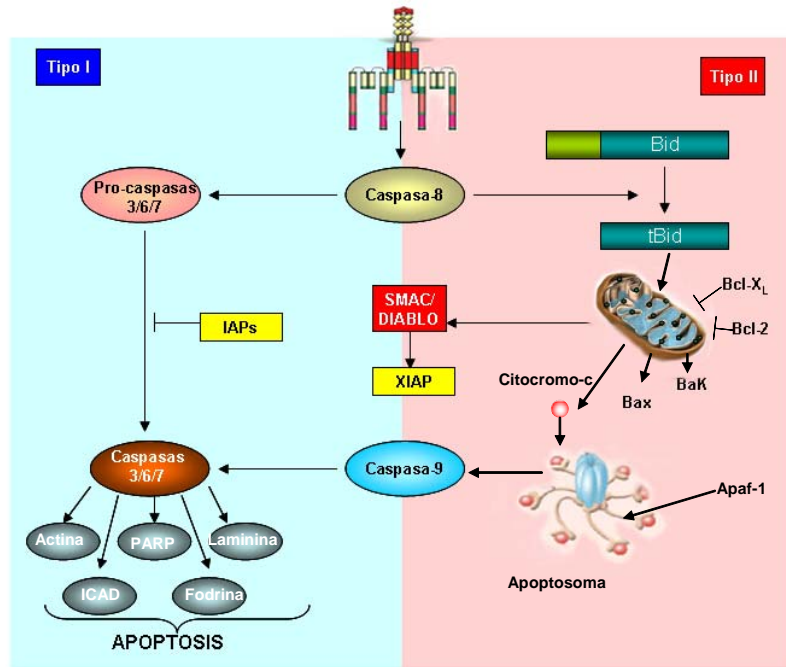


Fig. 6. Vía extrínseca

La vía extrínseca e intrínseca de apoptosis de células tipo II conectan entre sí por Bid; conexión que sirve como amplificación de la señal de apoptosis (Korsmeyer, 2000).

La ocupación de Fas también puede llevar al reclutamiento a los dominios DD del receptor de la proteína DAXX (Death Associated Protein) y la proteína RIP1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1). Ninguna de estas proteínas es esencial para la apoptosis inducida por Fas, pero se ha descrito que regulan la sensibilidad de la célula a apoptosis (Curtin, 2003).

DAXX recluta y activa ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) que a su vez puede activar JNK (c-jun N-terminal Kinase) y p38 (Tobiume, 2001). La activación de ASK1 puede inducir apoptosis en varios tipos celulares mediante la activación de caspasas vía mitocondrial (Hatai, 2000), aunque también se ha descrito que la interacción DAXX-ASK1 puede inducir muerte celular independiente de caspasas y de la actividad quinasa de ASK1 (Curtin, 2003).

RIP1 es una serín/treonín quinasa que en células T es capaz de inducir apoptosis independientemente de la activación de caspasa-8 (Holler, 2000). RIP1 puede interaccionar con RAIDD, que lleva a la activación de la caspasa-2 (Curtin, 2003; Tinel, 2004).

Finalmente los receptores Fas activados son internalizados mediante endosomas y posteriormente se reciclan volviendo a su situación inicial en la membrana (Algeciras-Schimmich, 2002).

4 MOLECULAS REGULADORAS DE LAS DIFERENTES VIAS APOPTOTICAS

La actividad de las caspasas está regulada por dos familias de proteínas: IAPs y c-FLIP.

4.1 IAPs (Inhibition of Apoptosis Protein)

Son proteínas citoplasmáticas anti-apoptóticas que inhiben caspasas iniciadoras y efectoras. Fueron descritas en baculovirus y se han identificado 8 en mamíferos entre las que se encuentran XIAP (X-chromosome linked IAP), c-IAP-1 y c-IAP-2. Todas poseen al menos un dominio rico en Cys/His denominado BIR (Baculovirus IAP Repeat) mediante el que interaccionan con las caspasas.

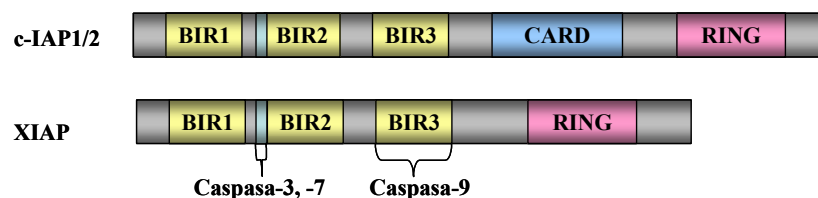


Fig. 6. Estructura de los miembros de la familia de proteínas IAPs.

XIAP, IAP-1 e IAP-2 inhiben directamente caspasa-3, caspasa-7 y caspasa-9. Poseen tres dominios BIR y un dominio RING (Really Interesting New Gene) con actividad E3-ubiquitín-ligasa que sensibiliza a las propias IAPs y a las caspasas a las que se unen, a su degradación vía proteasoma. XIAP, IAP-1 e IAP-2 son inhibidas por proteínas mitocondriales como Smac/DIABLO y HtrA2 (Heat shock-induced serine protease-2) o por la proteína nuclear XAF1 (XIAP-Associated Factor 1) cuando se encuentran en el citoplasma (Byun, 2003; Holcik, 2001).

Entre los dominios BIR y RING, IAP-1 e IAP-2 tienen el dominio CARD que les permite interaccionar con otras proteínas que posean ese dominio (Riedl, 2004).

4.2 **c-FLIP (cellular FLICE/caspasa-8 Inhibitory Protein)**

c-FLIP, identificada como proteína viral, interviene en la regulación de la apoptosis mediada por receptores de muerte. Se expresa mayoritariamente de dos formas diferentes como consecuencia de splicing alternativo: c-FLIP_S (short), formada únicamente por dos dominios DED y c-FLIP_L (long) que además de los dominios DED en el extremo amino terminal, tiene en su extremo carboxilo terminal un dominio homólogo al catalítico de caspasa-8 pero sin actividad enzimática. Recientemente se ha identificado una tercera isoforma: c-FLIP_R (Golks, 2005) que estructural y funcionalmente es muy semejante a c-FLIP_S.

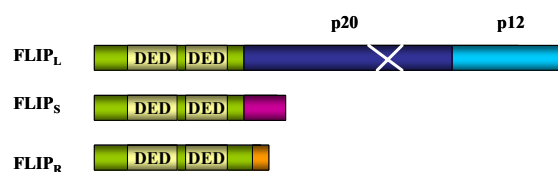


Fig. 7. Isoformas de c-FLIP.

La expresión de c-FLIP está regulada por NF-κB (Kreuz, 2001; Micheau, 2001), la vía MAPK/ERK (Yeh, 1998; Panka, 2001) y Akt (Panka, 2001; Uriarte, 2005; Suhara, 2001; Nam, 2003; Kondo, 2005). Ensayos realizados con el inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida, reflejan que tanto c-FLIP_L como c-FLIP_S tienen una vida media muy corta. Las dos isoformas son degradadas vía proteasoma, sin embargo diferencias estructurales en el extremo carboxilo terminal de c-FLIP_S le hacen más susceptible de ser ubiquitinizado con

respecto a c-FLIP_L. Es por eso que c-FLIP_S es degradado más rápidamente que c-FLIP_L y presenta una vida media inferior (Chanvorachote, 2005; Poukkula, 2005).

Mecanismos de acción de c-FLIP

Las dos formas de c-FLIP pueden ser reclutadas al DISC mediante sus dominios DED interaccionando con FADD y compitiendo con pro-caspasa-8.

El papel anti-apoptótico de c-FLIP_S está bien establecido tanto mediante ensayos de sobreexpresión (Kirchhoff, 2000; Krueger, 2001; Nam, 2003) así como mediante la inhibición de su expresión utilizando RNAs de interferencia (Wilson, 2007).

Respecto al papel de c-FLIP_L existe cierta controversia ya que se le han atribuido tanto funciones pro- como anti-apoptóticas. Estudios realizados en ratones deficientes en c-FLIP_L y en líneas celulares que lo expresan establemente apoyan la función anti-apoptótica de c-FLIP_L (Irmeler, 1997; Yeh, 1998).

Micheau propone un mecanismo en el que, a diferencia de c-FLIP_S que inhibe los dos procesos proteolíticos de activación de caspasa-8, c-FLIP_L permite el primer procesamiento en el que la pro-caspasa-8 (p55) origina los fragmentos p43/41 y p10 de caspasa-8 en el DISC. Sin embargo, c-FLIP_L bloquea el procesamiento posterior que genera p18 previniéndose así la activación de caspasa-8 y la inducción de apoptosis. El heterodímero formado por pro-caspasa-8 y c-FLIP_L se mantiene en la membrana plasmática; la pro-caspasa-8 es parcialmente activada y actúa sobre sustratos localizados en la proximidad del DISC (Micheau, 2002).

Krueger y Chang, expresando de forma ectópica c-FLIP_L, han propuesto que c-FLIP_L puede actuar como inhibidor de la activación de la caspasa-8 o como activador de la vía dependiendo de los niveles de expresión de esta proteína (Krueger, 2001; Chang, 2002). Sin embargo, los estudios llevados a cabo utilizando RNAs de interferencia, que producen una bajada de los niveles endógenos de c-FLIP_L, coinciden en señalar un papel inhibidor de c-FLIP_L en la apoptosis mediada por receptores de muerte (Wilson, 2007; Wang, 2007).

5 VÍAS DE SUPERVIVENCIA

El papel principal de las vías de supervivencia es inhibir la función de las proteínas pro-apoptóticas y activar la función de las anti-apoptóticas.

5.1 VIA DE LA PI3K/Akt

La vía de supervivencia más estudiada es la de **PI3K/Akt**. La activación de la PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) por distintas señales de supervivencia conlleva la producción del segundo mensajero fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) que recluta a la membrana plasmática proteínas con dominio PH (Pleckstrin Homology domain) como PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent kinase-1), AKT/PKB (Protein Kinase B), PKC (Protein Kinase C) y las fosfatasas SHIP (Src homology 2-containing-inositol 5'phosphatase) y PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome ten) que regulan negativamente la vía defosforilando los fosfatidil-inositoles.

AKT es una serín/treonín quinasa que, en su forma inactiva, se encuentra en el citoplasma. Tras ser reclutada a membrana (Milburn, 2003) es activada por fosforilación mediada por las proteínas quinasas PDK1 (Thr308) y PDK2 (Ser 473).

Existe abundante bibliografía que aporta datos sobre el papel inhibidor de apoptosis de Akt, tanto en la apoptosis mediada por la vía intrínseca como por la extrínseca.

En el caso de la vía intrínseca, las principales dianas de Akt son (Song, 2005):

- **Bad**; su fosforilación por Akt en Ser 136 la transforma en diana de las proteínas 14-3-3 que la mantienen en el citoplasma e impiden su interacción con otros miembros pro-apoptóticos como Bcl-2 o Bcl-X_L (Datta, 1997; del Peso, 1997).
- **Caspasa-9**: Su fosforilación por Akt bloquea su procesamiento y activación (Cardone, 1998) inducido por otras señales.
- **Factores de transcripción Forkhead**. Factores implicados en aumentar la expresión de proteínas apoptóticas como Bim. La fosforilación por Akt los hace diana de las proteínas 14-3-3 que los retienen en el citoplasma, impidiendo su translocación al núcleo y su función pro-apoptótica (Brunet, 1999).

- **La proteína quinasa IκK-α** (Iκβ Kinase alpha). Akt activa IκK-α por fosforilación en Thr23. Una vez activada IκK-α fosforila a Iκβ, inhibidor del factor NFκB que es considerado tras Akt, el factor más importante de supervivencia. La fosforilación de Iκβ lo marca para su ubiquitinación y posterior degradación vía proteasoma. Una vez degradado el inhibidor Iκβ, NFκB se transloca al núcleo donde induce la expresión de proteínas anti-apoptóticas como PTEN (fosfatasa que hidroliza PIP3) (Oces, 1999).

Akt también juega un papel protector frente la apoptosis vía extrínseca. Es capaz de regular positivamente los niveles de expresión de **Fas** (Ivanov, 2002) y **c-FLIP** (Panka, 2001; Uriarte, 2005) y negativamente los de **FasL** (Uriarte, 2005) así como de fosforilar y estabilizar a **XIAP** que inhibe a las caspasas -3, -7 y -9 (Dan, 2004). Akt inhibe también la apoptosis que media **tBid**, disminuyendo la homodimerización de Bax y Bak que promueve la liberación de citocromo-c (Majewski, 2004).

5.2 VIA DE LAS MAPKs.

Algunas de las la vías de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) también se ha implicado en la supervivencia de diferentes líneas celulares. Las MAPK son serín/treonín quinasas que se activan, en respuesta a diferentes estímulos extracelulares y procesos internos, mediante fosforilaciones en cascada (Johnson, 2002).

La familia de las MAPK está formada por cinco subfamilias, cada una compuesta por tres proteínas quinasas. Tres subfamilias han sido las más estudiadas: ERK1/2 (Extracellular Signal-related Kinases), p38 y SAPK/JNK (Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal protein Kinase) (Jhonson, 2002).

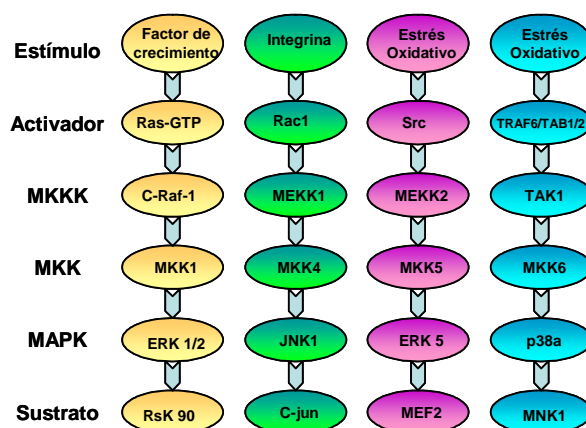


Fig. 10. Vías de las MAPK.

Existen mecanismos que garantizan la especificidad en la respuesta de las distintas MAPKs. Las señales de supervivencia celular activan principalmente la vía de la MAPK: ERK1/2. Las quinasas que componen esta vía son: Raf (MAPKKK) que activa a MEK1/2 (MAPKK) que a su vez fosforila y activa a ERK1/2 (MAPK).

ERK 1/2 activada ejerce su función fosforilando en Ser y Thr sustratos tanto en el citoplasma como en el núcleo donde se transloca.

Mecanismos mediante los que **ERK 1/2** inhibe la apoptosis vía **intrínseca**:

- Fosforilación de la quinasa **RSK** (p90 Ribosomal S6 kinase) en el citoplasma que produce su activación. RSK fosforila en la Ser 112 al factor pro-apoptótico Bad lo que inhibe su función (Bonni, 1999).
- Fosforilación de miembros de la familia Bcl-2 como **Bim** (proteínas “solo BH3” pro-apoptótica) que en su estado fosforilado es inactivo (Harada, 2004); y **Bcl-2** (anti-apoptótico) que al ser fosforilado se estabiliza (Breitschopf, 2000).
- En el núcleo regula la transcripción de varios genes anti-apoptóticos como **Bcl-2**, **Bcl-X_L** y **Mcl-1** (Boucher, 2000).

En el caso de la apoptosis **extrínseca** se ha descrito que, en células T, ERK1/2 activa aumenta los niveles de **c-FLIP** (Yeh, 1998; Panka, 2001; Wang, 2002), disminuyendo la apoptosis inducida por Fas.

5.3 **VIA DE LA JNK**

JNK puede promover o inhibir la apoptosis dependiendo del tipo celular, el estímulo implicado y la duración de su activación. Se ha descrito que las primeras etapas de activación de JNK pueden mediar supervivencia mientras que la activación sostenida puede mediar la muerte celular (Weston, 2007).

JNK puede activar la vía apoptótica **intrínseca** fosforilando miembros de la familia Bcl-2, activando pro-apoptóticos como **Bax**, **Bid**, **Bmf**; e inactivando anti-apoptóticos como **Bcl-2**, **Bcl-X_L**, y **Mcl-1**. También puede fosforilar e inactivar a las proteínas **14-3-3** permitiendo la liberación de miembros pro-apoptóticos (Weston, 2007).

JNK también es capaz de regular la vía **extrínseca** promoviendo la degradación de c-FLIP_L. JNK fosforila y activa a **Itch**, que es una E3 ubiquitin ligasa que ubiquitina c-FLIP_L señalizándolo a degradación vía proteasoma (Chang, 2006). JNK además puede regular la expresión de **FasL** (Zhang, 2000).

5.4 VIA DE LA p38

p38 tiene un papel bien establecido en inflamación. Sin embargo, en apoptosis el papel de p38 parece depender del tipo celular, el estímulo y la isoforma de p38 que actúe. Se ha descrito que la isoforma p38- α induce apoptosis mientras que la isoforma p38- β la inhibe (Nemoto, 1998).

La inducción de apoptosis por p38 puede realizarse a través de la vía **intrínseca** mediante fosforilación de **Bcl-2** (produciendo su inhibición) o mediante la regulación de la expresión y translocación de **Bax** (Porras, 2004).

p38 promueve también apoptosis regulando la vía **extrínseca**. p38 es capaz de regular la expresión de **Fas** (Porras, 2004) y **FasL** (Hsu, 1999; Zhang, 2000) así como la presencia de c-FLIP_S en el DISC (Tourian, 2004).

5.5 VIA DE LAS JAK/STATS

JAK (Janus Activated Kinase) es un receptor transmembrana con actividad Tyr quinasa. Su estimulación mediante citoquinas, factores de crecimiento u hormonas provoca su dimerización y transactivación mediante fosforilaciones en residuos de Tyr. Una vez activado, JAK recluta y fosforila en residuos de Tyr a las proteínas STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription family of transcription factor). Las proteínas STAT fosforiladas dimerizan y se translocan al núcleo donde inducen la transcripción de genes implicados en crecimiento, diferenciación, supervivencia y desarrollo celular. En el núcleo las proteínas STAT son defosforiladas y exportadas al citoplasma donde son degradadas.

Se han identificado siete miembros STAT (-1, -2, -3, -4, -5A, -5B y -6) (Battle, 2002).

Se ha descrito que STAT-1 es capaz de inducir la expresión de genes pro-apoptóticos como Fas, FasL o de algunas caspasas. También puede inducir apoptosis mediante la asociación e inhibición a NF- κ B (Battle, 2002).

STAT-3 y STAT-5, a diferencia de STAT-1, inhiben la apoptosis induciendo la expresión del factor anti-apoptótico Bcl-X_L. STAT-3 además inhibe la expresión de Fas y del factor pro-apoptótico Bax (Battle, 2002).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral han sido:

- Estudio de la sensibilización a apoptosis mediada por Fas por privación de suero en células tumorales resistentes.
- Identificación de distintos mecanismos empleados por el suero en la protección de apoptosis mediada por Fas en las líneas celulares HeLa, BxPC3 y AsPC1.
- Estudio de la implicación de la proteína quinasa Akt en la resistencia a apoptosis en las diferentes líneas celulares.

MATERIALES Y METODOS

1.MATERIALES

1.1 Anticuerpos:

Primarios:

• anti-Akt1/2	Santa Cruz Biotechnology
• anti-pAkt (Ser473)	Cell Signalling
• anti-pBad (Ser 136)	Cell Signalling
• anti-Bcl-x _L	Santa Cruz Biotechnology
• anti-Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology
• anti-Cleaved caspase-8 (Asp391)	Cell Signalling
• anti-Cleaved caspase-9 (Asp315)	Cell Signalling
• anti-ERK 2	Santa Cruz Biotechnology
• anti-pERK 1/2	Cell Signalling
• anti-FADD	BD Biosciences
• anti-Fas (IgG)	BD Biosciences
• anti-Fas (IgM, CH11)	MBL
• anti-FLIP	Alexis Biochemicals
• anti-pGSK3 β (Ser9)	Cell Signalling
• anti-c-IAP1/2	BD Biosciences
• anti-pJNK	Cell Signalling
• anti-c-Myc (N-262)	Santa Cruz Biotechnology
• anti-pp38	Cell Signalling
• anti-pRaf (Ser259)	Cell Signalling
• anti-RIP	Abcam
• anti-XIAP	BD Biosciences

Secundarios acoplados a HRP:

• anti-IgG de conejo	Cell Signalling, Nordic I.Laboratories
• anti-IgG de ratón	Alexis Nordic I. Laboratorios

Secundarios acoplados a Fluoróforo:

• anti-IgG de conejo-FITC	Sigma-Aldrich
---------------------------	---------------

1.2 Cultivos Celulares:

- | | |
|----------------------------|--------------------|
| • RPMI 1640 | Gibco |
| • DEMEM | Gibco |
| • HEPES | Sigma |
| • FBS (Suero Fetal Bovino) | Life Technologies |
| • L-glutamina | Bio-Whittaker |
| • Gentamicina | Laboratorio Normon |
| • 0,5% Tripsina-EDTA | Gibco |
| • EDTA 0,5M pH 8 | Merck |

1.3 Transfección celular:

- | | |
|--------------------------------------|----------------|
| • CalPhos Mammalian transfection Kit | BD Biosciences |
| Solución de calcio 2 M | |
| Bufer Hepes 2X (HBS 2X) | |
| Agua | |

1.4 Estímulos:

- | | |
|---------------------------------------|---------------|
| • Set Fas Ligando | Sigma |
| • Inhibidor de MEK (UO126) | Tocris |
| • Inhibidor de PI3K (LY294002) | Tocris |
| • Inhibidor de caspasa-8 (Z-IETD-FMK) | Calbiochem |
| • Cicloheximida | Sigma-Aldrich |
| • IGF-1 | Peptrotech® |

1.5 Ciclo Celular:

- | | |
|----------------------|---------------|
| • RNAsa A | Roche |
| • Yoduro de Propidio | Sigma-Aldrich |
| • Etanol | Merck |

1.6 Medida de concentración de proteínas:

- | | |
|-------------------------|---------|
| • Bio-Rad Protein assay | Bio-Rad |
|-------------------------|---------|

1.7 Otro material utilizado:

- | | |
|-------------------------------------|------------------|
| • Acrilamida-Bisacrilamida (37,5:1) | Bio-Rad |
| • SDS | Bio-Rad |
| • Persulfato amónico | Bio-Rad |
| • Temed | Sigma-Aldrich |
| • Marcadores proteína preteñidos | Invitrogen |
| • Igepal (NP-40) | Sigma-Aldrich |
| • β -Mercaptoetanol | Merck |
| • DTT | Sigma-Aldrich |
| • BioTrace TM PVDF | Pall Corporation |
| • Metanol | Merck |
| • Rojo Ponceau | Carlo Ebra |
| • Tween 20 | Sigma-Aldrich |
| • BSA | Sigma-Aldrich |
| • Leche semidesnatada en polvo | La Asturiana |
| • Azul de bromofenol | Bio-Rad |
| • X-Ray FILM/medical | Konica Minolta |

1.8 Tampones y soluciones:

- *Tampón de lisis celular para inmunodetección de proteínas por Western blot:* HEPES pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10%, NP40 1%, β -Glicerofosfato 50 mM, Ortovanadato 1 mM, Ac. Okadaico 3 nM y 1 tableta/50 ml mezcla de inhibidores (Roche).
- *Tampón de carga SDS (Laemmli)** Tris-HCl 250 mM pH 6,8, Glicerol 8%, SDS 4%, azul bromofenol 0,01% y DTT 200 mM.
- *Tampón de extracción de DNA:* Na₂HPO₄ 0.2 M, Ac. Cítrico 4 mM.
- *TBS*:* Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM.
- *TTBS:* TBS, Tween-20 0,1%.
- *PBS 1x*:* Na₂HPO₄ 7H₂O 43 mM, KH₂PO₄ 1,4 M, NaCl 137 mM, KCl 27 mM.

(*)-Estos medios, junto con los medios de cultivo han sido suministrados por el servicio Técnico de Preparación de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”.

2 METODOS

2.1 Cultivos celulares.

Para la preparación de los medios de cultivos, el suero fetal bovino (FBS) es descomplementado previamente mediante una incubación de 30 min a 50°C.

- Células Jurkat

Línea linfoide humana derivada de una leucemia aguda de linfocitos T. Se mantiene a 97% de humedad relativa, 37°C y 5% CO₂ a una densidad celular de 0,1-0,5 x10⁶ células/ml. El medio de cultivo utilizado es RPMI suplementado con 10% FBS descomplementado, 2 mM L- glutamina y 50µg/ml gentamicina. El pase celular se realiza dos veces por semana; tras centrifugar las células a 1000 r.p.m. durante 5min se retira el medio anterior y se renueva por medio RPMI 10% FBS completo.

- Células HeLa

Células adherentes originarias de carcinoma epitelial de cervix humano. Se mantienen en medio DEMEM-HEPES 20 mM pH 7,5 (DMEM-HEPES), suplementado con 5% FBS descomplementado, 2 mM L-glutamina y 100 µg/ml gentamicina a una temperatura de 37°C, 97% de humedad relativa y 5% CO₂. El pase celular se realiza tres veces por semana en un ratio 1:3.

- Células AsPC1

Células adherentes originarias de adenocarcinoma pancreático humano. Se mantienen en medio RPMI con 10% suero (FBS) descomplementado, 1 mM piruvato sódico, 2 mM L-glutamina y 100 µg/ml gentamicina a 97% de humedad relativa, una temperatura de 37°C y 5% CO₂. El pase celular se realiza dos veces por semana en un ratio 1:2.

- Células BxPC3

Células adherentes originarias de adenocarcinoma pancreático humano. Se mantienen en medio RPMI con 10% FBS descomplementado, 1 mM piruvato sódico, 2 mM L-Glutamina y 100 µg/ml gentamicina a 97% de humedad relativa, una temperatura de 37°C y 5% CO₂. El pase celular se realiza tres veces por semana en un ratio 1:3.

Las células adherentes: HeLa, AsPC1 y BxPC3 se mantienen en placas de 100 mm de diámetro (p100). El pase celular es tres veces por semana en un ratio de 1:3. Para ello, tras retirar el medio y lavar con PBS, la células se levantan añadiendo 1ml de tripsina-EDTA e incubándolas 1 min a 37°C. Tras la incubación, las células se resuspenden en 2-3ml de medio completo (DMEM-HEPES 5%FBS o RPMI 10% FBS) y se llevan al volumen requerido para el experimento a realizar.

2.2 Construcciones

- pCDNA3

De la casa comercial Invitrogen. Es un plásmido bajo el control del promotor CMV que se utiliza como vector control.

- PBB14-EGFP

Cedido por el Dr. Banfield, codifica la proteína de fusión Us9-EGFP bajo el control del promotor CMV. El dominio Us9 corresponde a una proteína de membrana tipo II que se encuentra en la envuelta de los pseudorabies virus (PRV), de la subfamilia de los alpha-herpesvirus. En células infectadas o transfectadas con este plásmido el motivo EGFP se localiza en el exterior de la célula o en el lumen del aparato de Golgi al que llega mediante endocitosis de la membrana plasmática. Al mantenerse unida a membrana esta proteína de fusión, no se pierde al fijar y permeabilizar las células. Se utiliza como gen control en las transfecciones celulares.

- SFFV-Bcl-2

Cedido por el Dr. Luis del Peso, codifica la proteína Bcl-2 bajo el control del promotor T3.

- Myr-HA-Akt

Cedido por el Dr. J. Renart, codifica la proteína HA-Akt miristoilada en su extremo N- terminal. Esta modificación ancla a la proteína en la membrana plasmática donde es fosforilada y activada por la PDK 1/2 (3-Phosphoinositide-dependent kinase 1/2).

2.3 Transfección con Fosfato Cálculo.

La transfección con fosfato cálcico consiste en la formación de precipitados insolubles que contienen el DNA que se desea transfectar, que son endocitados por las células. Las soluciones utilizadas para la transfección así como el protocolo seguido se obtuvieron del Kit de BD Biosciences: CalPhos Mammalian transfection.

Para la transfección de las líneas celulares Hela, AsPC1 y BxPC3, el día anterior se preparan $1,6 \times 10^6$ células en medio completo (DMEM-HEPES 5% FBS ó RPMI 10% FBS) por placa de 100 mm de diámetro (p100) encontrándose en crecimiento exponencial en el momento de la transfección. Para realizar la transfección y tras renovar el medio completo a las células, se prepara dos soluciones.

Solución 1:

Compuesta por 0,25 M Calcio y 14 μg DNA/p100 (4 μg corresponden al vector reportero PBB14-GFP) en agua.

Solución 2

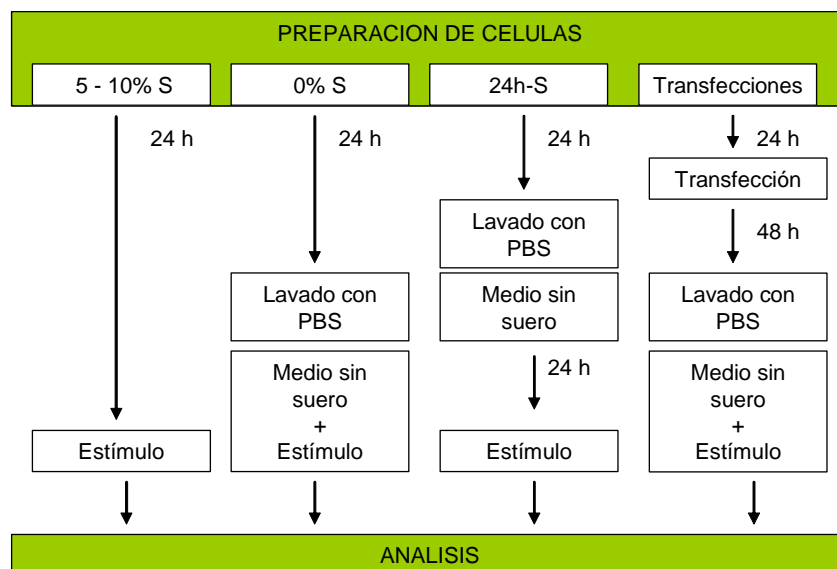
Compuesta por el mismo volumen que la solución 1 de HBS 2X.

Gota a gota y sobre el vortex se vierte la solución 1 sobre la solución 2 y se incuba 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los precipitados formados se añaden gota a gota sobre las células. Dieciséis horas después de la transfección se cambia el medio de cultivo que contiene los precipitados de fosfato cálcico por medio completo (DMEM-HEPES 5% FBS para las células HeLa y RPMI 10% FBS para las células AsPC1 y BxPC3).

2.4 Estimulación celular

El día previo a la estimulación celular se preparan 5×10^5 células por placa de 60 mm de diámetro (p60) en su correspondiente medio completo. Tras 24 h en cultivo la estimulación se realiza en tres condiciones distintas: bien añadiendo el estímulo sobre el medio completo (5-10% FBS), realizándose un lavado con PBS para retirar el suero del cultivo antes de añadir el medio sin suero a la vez que el estímulo (0%); o bien manteniendo las células en cultivo, tras un lavado con PBS, con medio sin suero durante otras 24 h antes de añadir el estímulo (24h-S).

La estimulación de células transfectadas se realiza transcurridas 48 h desde la transfección y simultáneamente al ayuno de las células.



Esquema 1. Estimulación celular

La adición de los s inhibidores LY o UO a los cultivos celulares se realiza 30 min antes de añadir el CH11; la preincubación con IGF-1 es de 10 min. La cicloheximida se añade al tiempo que el CH11.

2.5 Citometría de flujo

2.5.1 Análisis de la apoptosis celular

Después de los tratamientos las células Jurkat, que crecen en suspensión, se centrifugan a 1000 r.p.m. durante 5 min y se lavan con PBS frío. Las Células HeLa, AsPC1 y BxPC3, que son adherentes, tras recoger el medio para no desechar ninguna célula no adherida, se levantan pipeteando con PBS-EDTA 5 mM. La suspensión celular se centrifuga 5 min a 1000 r.p.m. y se lava con PBS frío. Para fijar y permeabilizar las células se resuspenden en 70% de etanol, que se añade gota a gota y agitando suavemente, y se incuban durante 5 min a 4°C. Transcurrida la incubación, para eliminar completamente el etanol se lavan con PBS. Posteriormente las células se tratan con tampón fosfato-citrato (descrito en materiales) durante 10 min a 37°C para favorecer la eliminación de los fragmentos más pequeños de DNA. Por último, las células se resuspenden en PBS con 100 µg/ml de RNasa A y se incuban durante 20 min a temperatura ambiente para eliminar restos de RNA. Una vez fijadas y permeabilizadas las células, se marca el DNA añadiendo 40 µg/ml de yoduro de propidio. El análisis se realiza utilizando el citómetro de flujo FACSCan (Becton Dickinson Co.) que recoge la señal fluorescente del yoduro de propidio con un máximo de emisión a 575 nm, en la zona roja del espectro. Los porcentajes de células en apoptosis se calculan utilizando el programa WinMDI 2.8.

Para determinar la apoptosis de las células transfectadas se sigue el mismo protocolo de preparación de las muestras. En el análisis del ciclo celular mediante el citómetro de flujo se selecciona en primer lugar la población celular que expresa el vector reportero PBB14-GFP con un máximo de emisión a 509 nm, en la zona verde del espectro. Sobre la población seleccionada se realiza el análisis midiendo la fluorescencia del yoduro de propidio.

2.5.2 Análisis de expresión en superficie de Fas.

Las células se recogen en PBS-EDTA 5 mM y después de un lavado con PBS frío se resuspenden y se incuban 30 min a temperatura ambiente en la solución de bloqueo PBS 5% BSA. Tras separar una muestra para utilizarla como control de fluorescencia del anticuerpo secundario, el resto de muestra se incuba con 1 µg/100 µl del anticuerpo anti-Fas (IgG) a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido ese tiempo las células se lavan dos veces con PBS y se incuban, incluyendo la muestra control, con el anticuerpo

secundario anti IgG de conejo acoplado al fluorocromo fluoresceína (FITC) con un máximo de emisión 520 nm, en la zona verde del espectro. Tras 30 min de incubación las células se lavan con PBS dos veces y se mide la fluorescencia adquirida en el citómetro de flujo FACSCan. El porcentaje de células que expresan Fas se determina con el programa WinMDI 2.8.

2.6 Preparación de lisados e inmunodetección en membrana de PVDF (Western blot)

La lisis celular se realiza sobre la placa de cultivo. Las células, mantenidas en las placas de cultivo, se lavan con PBS frío y tras eliminar muy bien todo el PBS se congelan rápidamente a -80°C. Sobre la placa, aún congelada, se añade el tampón de lisis (descrito en materiales, apartado 10) y a la vez que se van descongelando se despegan todas las células con un rascador. La suspensión celular se pasa a un eppendorf y se incuba a 0°C durante 20 min; posteriormente se centrifugan durante 20 min a 14000 r.p.m. a 4°C. El extracto celular correspondiente a la fracción soluble se recoge y se cuantifica la concentración de proteína mediante el método Bradford. Treinta microgramos de extracto proteico se someten a electroforesis en geles SDS-PAGE (8%-12%) en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente las proteínas se transfieren a una membrana de PVDF y se bloquean con TTBS 5% leche semidesnatada en polvo. La incubación con los anticuerpos primarios se realiza en TTBS 0,1% con 1% leche semidesnatada durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo se retira mediante 3 lavados de 10 min con TTBS. La unión del anticuerpo primario al antígeno se detecta mediante la incubación de la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente, preparado en TTBS 1% leche semidesnatada, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la retirada del exceso de anticuerpo secundario mediante 3 lavados con TTBS y uno final con TBS.

Las membranas una vez incubadas en el anticuerpo secundario acoplado a la enzima peroxidasa y tras ser lavadas son reveladas mediante quimioluminiscencia (ECL-Amersham) utilizando películas Konica Minolta.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. La privación de suero sensibiliza a células HeLa a la apoptosis inducida por Fas.

La estimulación de los receptores Fas, pertenecientes a la superfamilia de receptores de muerte TNF, mediante su ligando (FasL) o anticuerpos agonísticos, induce apoptosis en determinados tipos celulares. Para la transducción de la señal apoptótica es necesaria la trimerización del receptor que permite el agrupamiento intracelular de los dominios de muerte de los receptores y la formación del DISC. El anticuerpo anti-Fas de isotipo IgG no induce apoptosis ya que por sí mismo no produce la trimerización del receptor. Sin embargo, el anticuerpo anti-Fas de isotipo IgM (CH11) sí que promueve la trimerización de Fas y la inducción de apoptosis.

En células HeLa mantenidas en medio con 5% suero la estimulación con anticuerpos anti-Fas del isotipo IgG o IgM (CH11) no induce apoptosis. Sin embargo, las células Jurkat en presencia de 10% suero en el medio, presentan apoptosis cuando son estimuladas con el anticuerpo CH11 (Fig. 1A, 1B).

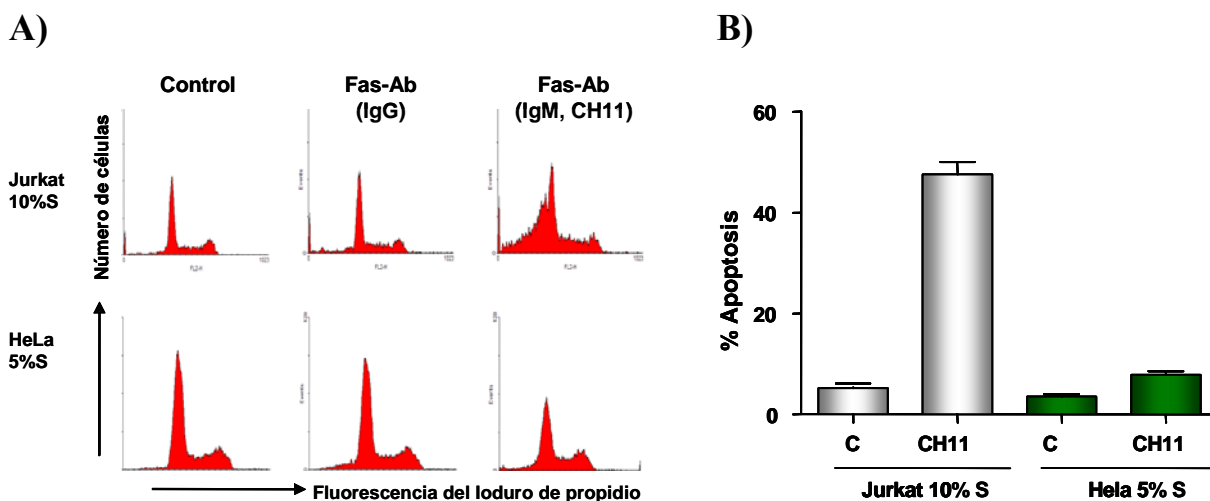


Fig. 1. Análisis de la apoptosis inducida tras la estimulación con anticuerpos anti-Fas en células Jurkat y HeLa. (A) Células Jurkat mantenidas en medio con 10% suero o células HeLa en medio con 5% suero se estimularon con anti-Fas (IgG o IgM (CH11) (400 ng/ml) durante 15 h. El análisis del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo. **(B)** Cuantificación de la apoptosis obtenida en células Jurkat mantenidas en medio con 10% suero o células HeLa en medio con 5% suero tras ser o no estimuladas durante 15 h con el anticuerpo CH11 (400 ng/ml). La gráfica muestra la media \pm SD de cuatro experimentos.

Por el contrario la privación de suero de células HeLa durante 24 h produce una sensibilización a apoptosis mediada por Fas. Así tras el ayuno de suero durante 24 h, células HeLa estimuladas con el anticuerpo CH11 o con FasL-FLAG junto al anticuerpo anti-FLAG, que permite la oligomerización de Fas, mueren por apoptosis. La estimulación con el anticuerpo anti-Fas del isotipo IgG o FasL-FLAG sin el anti-FLAG no induce apoptosis (Fig. 2). Estos resultados indican la especificidad de la apoptosis obtenida mediante la estimulación de los receptores Fas.

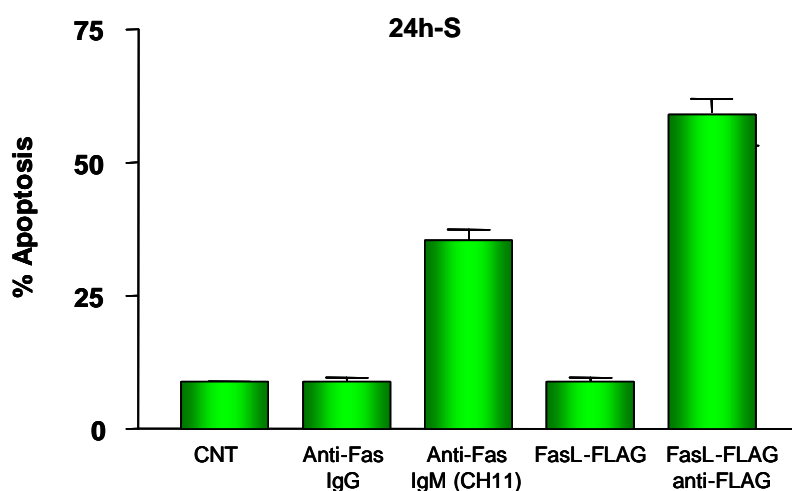


Fig. 2. Sensibilización del ayuno de suero de células HeLa a apoptosis inducida por Fas. Células HeLa ayunadas de suero durante 24 h se estimularon durante 15 h con: Anti-Fas (IgG, 400 ng/ml), CH11 (400 ng/ml), FasL-FLAG (200 ng/ml) o FasL-FLAG (200 ng/ml) + anti-FLAG (1 µg/ml). El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media \pm SD de cinco experimentos.

Para establecer la capacidad de sensibilización a apoptosis mediada por Fas que posee el ayuno de suero, las células HeLa se estimularon o no con CH11 durante 15 h en condiciones de 5% suero en el medio (5%S), simultáneamente al ayuno (0%) o tras 24 de ayuno (24h-S). De las tres condiciones probadas únicamente CH11 induce apoptosis de forma significativa cuando las células son ayunadas de suero 24 h previas a la estimulación. (Fig. 3).

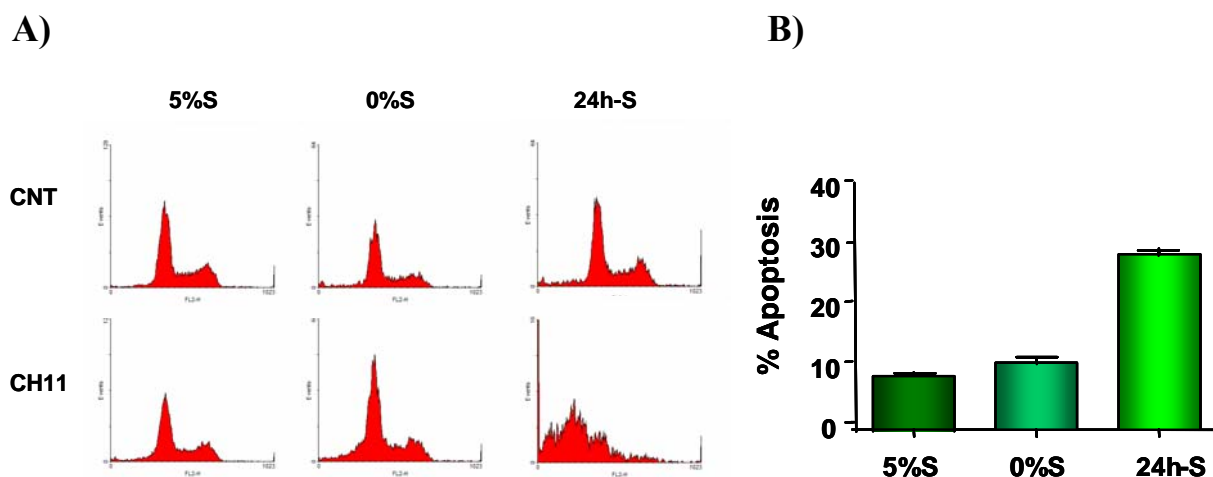


Fig. 3. Capacidad sensibilizadora del ayuno de suero en células HeLa a apoptosis inducida por CH11. (A) Células HeLa se estimularon con CH11 (400 ng/ml) en medio con 5% suero (5%S), simultáneamente al ayuno (0%) o tras un ayuno de 24 h (24h-S) durante 15 h. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo. (B) Representación de la apoptosis obtenida tras la estimulación de las células HeLa. La gráfica muestra la media \pm SD de cuatro experimentos.

Al incrementar la concentración de CH11 también se incrementa la inducción de apoptosis mediada por Fas en células HeLa ayunadas de suero (Fig. 4). Teniendo en cuenta los porcentajes de apoptosis obtenidos, se escogió la concentración de 0,4 μ g/ml de CH11 para los siguientes experimentos de inducción de apoptosis.

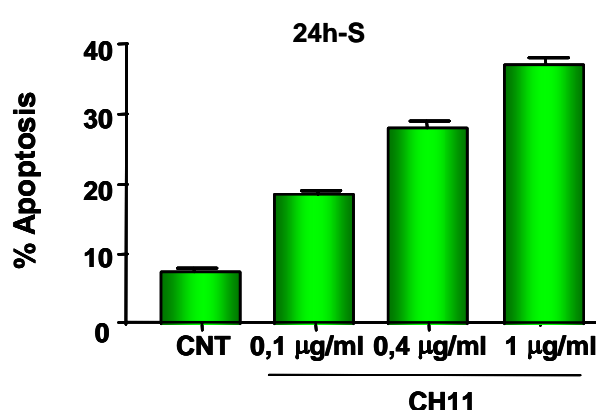


Fig. 4. La apoptosis dependiente de ayuno inducida por Fas en células HeLa es dependiente de la concentración de estímulo. Células HeLa ayunadas de suero durante 24 h se estimularon con diferentes concentraciones de CH11 (0,1-1 μ g/ml). Quince horas después se calculó el porcentaje de células apoptóticas. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos.

Para comprobar si la sensibilización a apoptosis producida por la privación de suero pudiera deberse al aumento del número de receptores Fas en superficie, se determinó la expresión de estos receptores mediante citometría de flujo en células HeLa mantenidas en presencia o ausencia de 5% suero. Los datos obtenidos muestran que, independientemente de la ausencia o presencia suero en el medio, las células HeLa mantienen el mismo elevado nivel de expresión del receptor Fas (Fig. 4B).

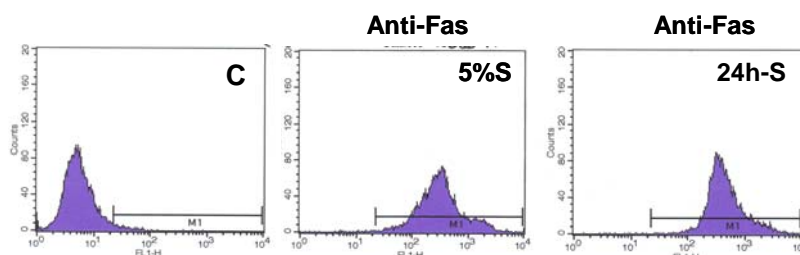


Fig. 5. La privación de suero no varía la expresión de receptores Fas en la superficie de células HeLa. Células HeLa mantenidas en medio con 5% suero (5%S) o ayunadas durante 24 h (24h-S) se estimularon con CH11 (400 ng/ml) durante 15 h. La expresión de receptores Fas en superficie se determinó mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo anti-Fas (Isotipo IgG) según se explica en Materiales y Métodos. Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes.

2. La privación de suero produce una disminución en los niveles de pAkt, pERK 1/2 y c-FLIP_S.

Para determinar si la privación de suero regula la expresión de proteínas implicadas en apoptosis, células HeLa se sometieron durante varios intervalos de tiempo a ayuno de suero. Se analizaron mediante western blot los niveles de c-FLIP (FLICE-Inhibitory protein) tanto la forma S como la L, y de FADD (Fas-associated death protein). Ambas proteínas forman junto a la pro-caspasa-8 y tras la activación del receptor Fas, el DISC (Death-inducing Signalling Complex). También se estudiaron los niveles de las proteínas pertenecientes a la familia de proteínas Bcl-2: Bcl_{XL}, Bad (apoptóticas) y Bcl-2 (anti-apoptótica), así como c-Myc (factor de transcripción implicado en proliferación y crecimiento celular y apoptosis); RIP ((Receptor-Interacting protein) Proteína reguladora de

NF- κ B) y las proteínas IAPs (Inhibitor of apoptosis) y XIAP que interaccionan e inhiben la actividad de varias caspasas.

Así mismo se determinó como afectaba la privación de suero a la actividad de diferentes quinasas implicadas en supervivencia. Para ello se analizó, mediante western blot, el estado de fosforilación, y con ello la actividad, de Akt, ERK 1/2, Raf, JNK y p38.

De todas las proteínas estudiadas, la privación de suero sólo produce descensos significativos en los niveles de c-FLIP_s y en el estado de fosforilación de ERK 1/2 y Akt (Fig. 6). En correlación con el descenso de Akt activada, tras el ayuno de suero, también disminuye la forma fosforilada de GSK3, que es sustrato de Akt (Datta, 1999).

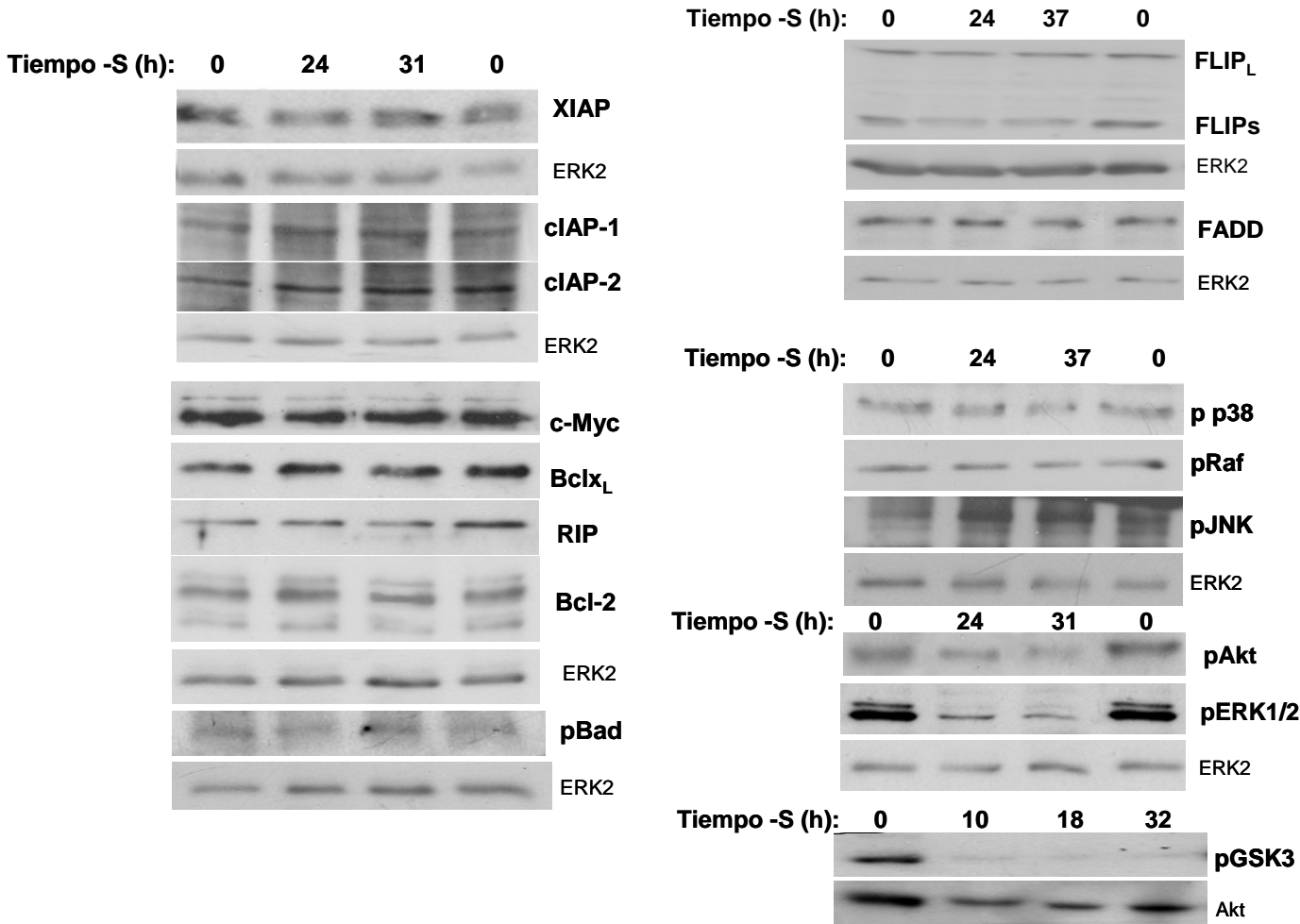


Fig. 6. La privación de suero en células HeLa produce una disminución en los niveles de c-FLIP_s, pAkt y pERK 1/2. Células HeLa se ayunaron de suero durante los tiempos indicados y 30-40 µg de los lisados totales se analizaron mediante western blot con los anticuerpos indicados. Se muestran datos representativos de cinco ensayos diferentes.

3. La actividad de Akt protege a las células HeLa de apoptosis.

Para investigar si el descenso de la fosforilación de ERK 1/2 y Akt que se observa en el ayuno de suero median la sensibilización de las células HeLa, analizamos en presencia o ausencia de 5% suero el efecto de inhibidores de estas dos vías: UO126 (UO), inhibidor de MEK 1, y LY294002 (LY), inhibidor de PI3K, en la inducción de apoptosis por estimulación con CH11. La inhibición de la vía de ERK 1/2 con UO (10 μ M) produce un ligero incremento en la apoptosis mediada por Fas tanto en presencia o ausencia de 5% suero en el medio. Sin embargo, al utilizar LY a una concentración de 20 μ M, que bloquea completamente la vía de Akt (Fig. 8B), se induce un alto porcentaje de células apoptóticas independientemente de la presencia o ausencia de 5% suero en el medio (Fig. 7).

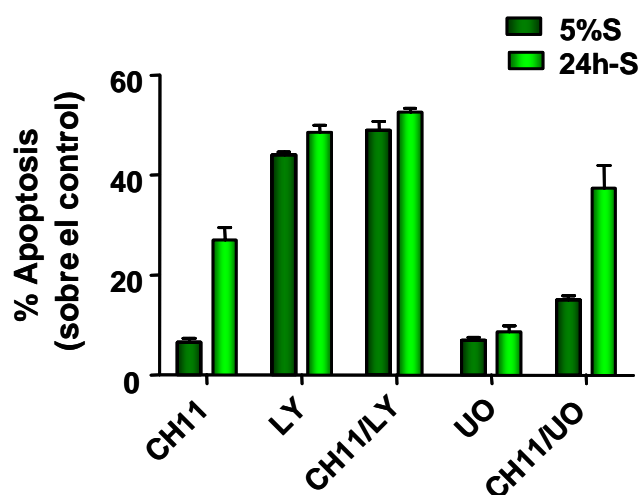


Fig. 7. La inhibición de la actividad Akt induce apoptosis en células HeLa independientemente de la presencia de suero en el medio. Células HeLa mantenidas en medio con 5% suero (5%S) o ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) se preincubaron durante 30 min con UO (inhibidor de MEK, 10 μ M) o con LY (inhibidor de PI3K, 20 μ M) y posteriormente se estimularon o no con CH11 durante 15 h. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos.

Estos datos indican que alguna de la vías que regula PI3 quinasa, es esencial en estas células para la prevención de apoptosis. Teniendo en cuenta que en células HeLa durante la privación de suero se produce una disminución en los niveles de pAkt, decidimos estudiar si el efecto protector que ejerce el suero sobre la inducción de la apoptosis podría deberse, al menos en parte, a la capacidad del suero de mantener Akt activa.

Para ello preincubamos células HeLa mantenidas en medio al 5% suero con bajas concentraciones de LY, y 30 min después se estimularon o no con CH11 (400 ng/ml) durante 15 h. El análisis del porcentaje de células apoptóticas tras la estimulación refleja que la reducción parcial del estado de fosforilación de Akt, obtenido al utilizar bajas concentraciones de LY (Fig. 8B), tiene un efecto sinérgico en la sensibilización de las células a la apoptosis inducida por estimulación con CH11 (Fig. 8A).

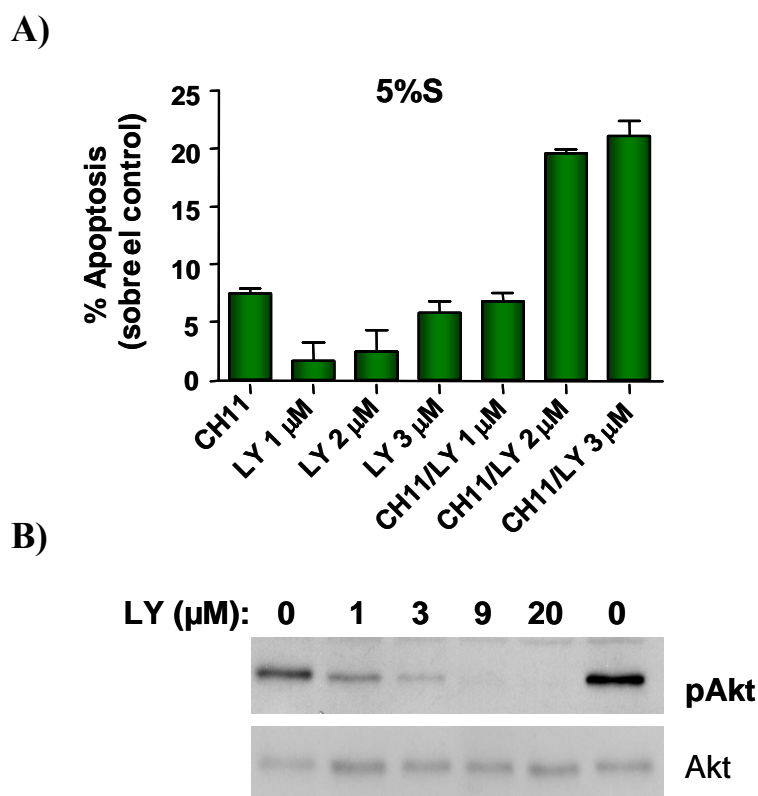


Fig. 8. La reducción en los niveles de Akt fosforilada sensibiliza sinérgicamente la inducción de apoptosis por estimulación con CH11. (A) Células HeLa mantenidas en medio con 5% suero (5%S) se preincubaron durante 30 min con varias concentraciones de LY (0-3 μ M), y posteriormente se estimularon o no con CH11 (400 ng/ml) durante 15 h. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos. (B) Células HeLa mantenidas en 5% suero se estimularon con diferentes concentraciones de LY (0-20 μ M) y tras 15 h los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot para determinar los niveles de pAkt. Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes.

Para analizar si la actividad de Akt es determinante en la protección de la apoptosis inducida por la estimulación con CH11 o LY, se transfectaron células HeLa con una versión

constitutivamente activa de Akt (Akt-Myr) y 48 h después de la transfección se trataron con LY o CH11 a la vez que se les retiró el suero del medio. Tras 15 de tratamiento (15h-S + estímulo) se analizó la apoptosis inducida por cada estímulo. La expresión de Akt-Myr ectópico redujo un 30% la apoptosis inducida por CH11. Por otro lado, la apoptosis inducida por LY (20 μ M) se revierte casi por completo, confirmando que la diana específica de LY en la vía de PI3 quinasa es Akt (Fig. 9).

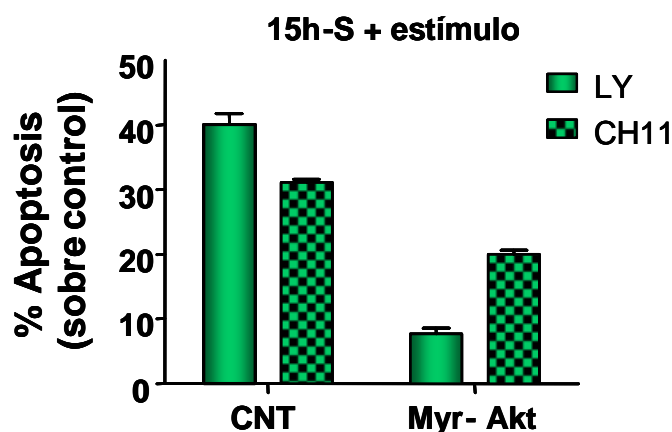
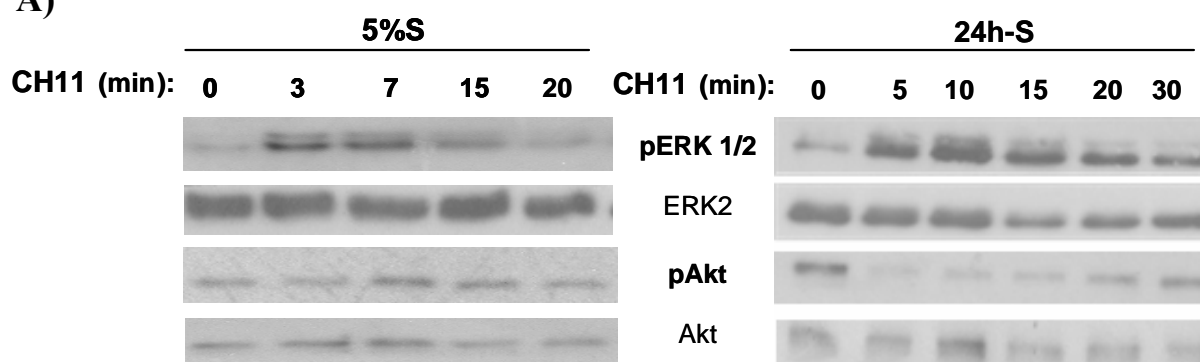


Fig. 9. La actividad Akt protege de la apoptosis inducida por LY y CH11 en células HeLa ayunadas de suero. Células HeLa co-transfectadas con PBB14-GFP (4 μ g) y vector vacío (CNT, 10 μ g), o con PBB14-GFP (4 μ g) y Akt-Myr (Myr-Akt, 10 μ g) fueron ayunadas de suero a la vez que estimuladas con LY o CH11 durante 15 h (15h-S + estímulo). Tras seleccionar mediante citometría de flujo la población de células que expresaban la proteína GFP, se calculó el porcentaje de células apoptóticas. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos.

Los datos obtenidos indican que el estado de fosforilación de Akt juega un papel importante en la inducción de apoptosis por estimulación de Fas. Por otro lado sólo en condiciones en las que la estimulación de Fas conduce a apoptosis se produce una bajada inmediata y transitoria en los niveles de pAkt. Así, la estimulación de células HeLa ayunadas de suero durante 24 h con anti-Fas del isotipo IgM (CH11), pero no con el anti-Fas del isotipo IgG, produce una bajada de pAkt entre 3 y 20 min tras la estimulación. En presencia de 5% suero, ni la estimulación con anti-Fas del isotipo IgG ni con anti-Fas del isotipo IgM (CH11) produce bajada transitoria de los niveles de pAkt (Fig. 10B), ni se induce apoptosis (Fig. 2).

Sin embargo, en todas las condiciones descritas, independientemente de que induzcan o no apoptosis, se detecta un incremento transitorio en los niveles de pERK 1/2 instantes después de la adición de los anticuerpos agonísticos de Fas (Fig. 9A, 9B). El hecho de que ERK 1/2 se active independientemente de que el estímulo utilizado produzca o no apoptosis, junto con los datos obtenidos al tratar las células en presencia o ausencia de suero con UO (Fig. 7), sugiere que la vía de ERK 1/2 no participa en la prevención de la apoptosis inducida por Fas en este tipo celular.

A)



B)

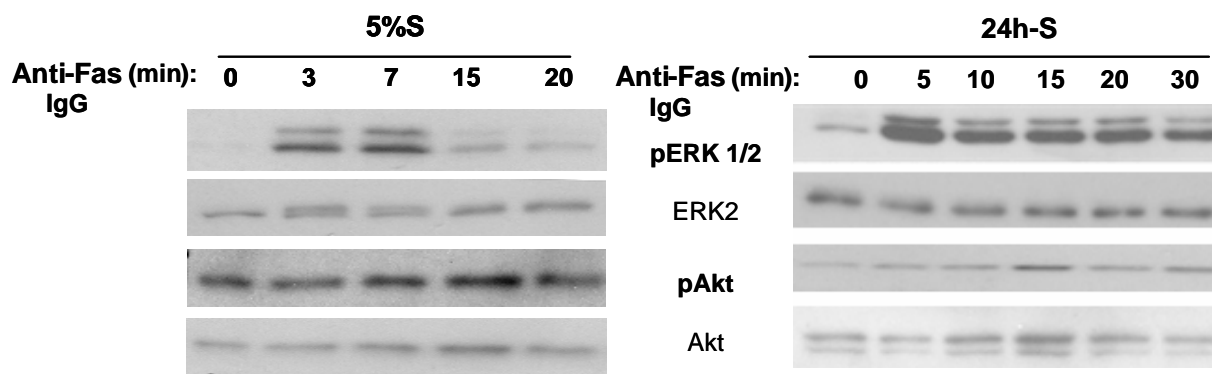


Fig. 10. La actividad Akt disminuye transitoriamente tras la estimulación de células HeLa ayunadas durante 24 h. Células HeLa en presencia (5%S) o ausencia de 5% suero (24h-S) (**A**) se estimularon con CH11 (400 ng/ml) o (**B**) se estimularon con anti-Fas (IgG, 400 ng/ml) durante los tiempos indicados. Los niveles de fosforilación de Akt y ERK 1/2 se determinaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-pAkt y anti-p-ERK 1/2. (**A**, **B**) Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes.

Para comprobar si la disminución transitoria de los niveles de Akt fosforilado tras la estimulación de Fas juega un papel relevante en la inducción de apoptosis, realizamos la misma estimulación en presencia de IGF-1, un activador de la vía de Akt (Fig. 11A). Células HeLa ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) y tras una preincubación de 10 min con IGF-1, se estimularon o no con CH11 (400 ng/ml) durante 15 h. La adición del IGF-1 inhibe la disminución transitoria de los niveles de Akt fosforilado y la inducción de apoptosis tras la estimulación con CH11 (Fig. 11B, 11C). Estos resultados indican un posible papel de la actividad Akt en las primeras etapas de la señalización a apoptosis.

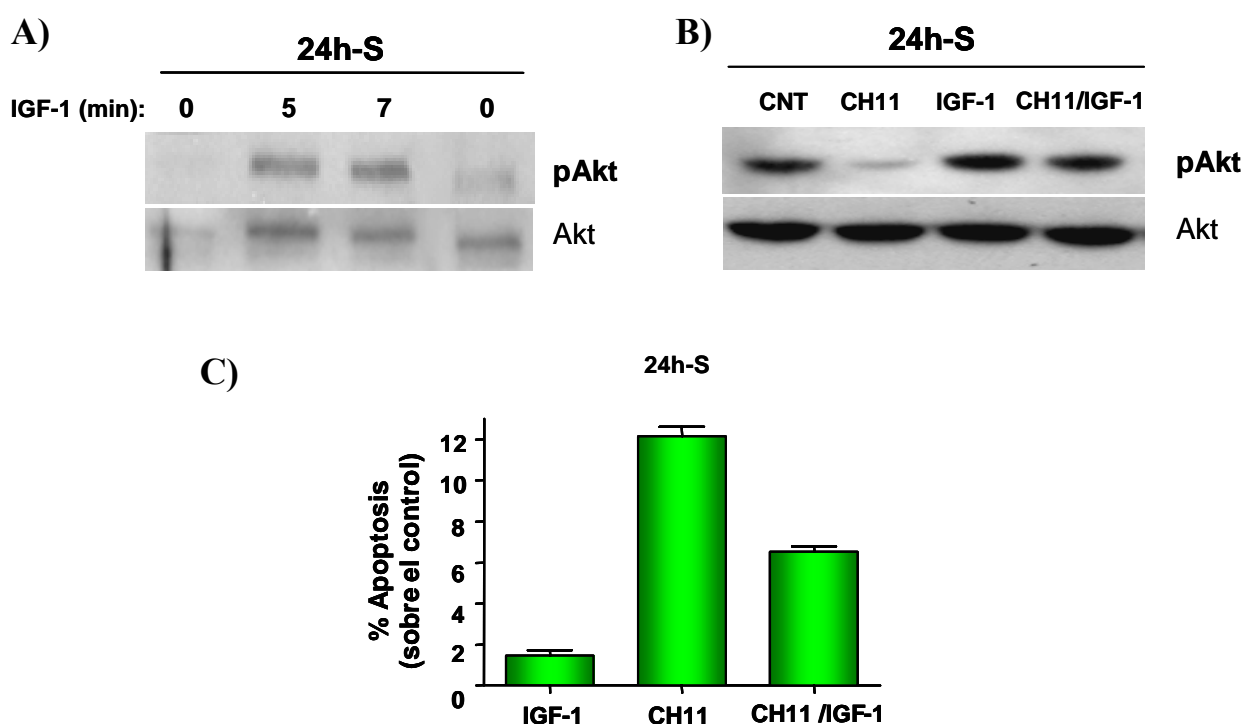


Fig. 11. La activación de Akt por IGF-1 disminuye la apoptosis mediada por Fas en células HeLa ayunadas de suero. (A) Células HeLa ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) se estimularon con IGF-1 (300 ng/ml) durante los tiempos indicados (B) Células HeLa ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) se preincubaron durante 10 min con IGF-1(300 ng/ml) y se estimularon o no con CH11 (400 ng/ml) durante 5 min. (A, B) Los lisados celulares (30 µg) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-pAkt y Akt como control de carga. Se muestran datos representativos de cuatro ensayos diferentes. (C) Células HeLa ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) se estimularon con IGF-1 (300 ng/ml), con CH11 (400 ng/ml) o con ambos estímulos, preincubando 10 min con IGF-1 antes de añadir CH11 durante 15 h. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media \pm SD de cuatro experimentos.

4. Papel de caspasa-8 y c-FLIP en la apoptosis inducida por Fas o LY en células HeLa.

Para determinar los mecanismos implicados en la apoptosis inducida en células HeLa por CH11 o por LY analizamos la activación de caspasa-8 y caspasa-9. Para detectar las formas activas de caspasa-8 y caspasa-9 se determinó la presencia de las subunidades p18 y p35 respectivamente que forman parte de las caspasas activas. La activación de caspasa-8 y caspasa-9, en células HeLa ayunadas de suero durante 24 h, se detecta aproximadamente 1 h después de la estimulación con CH11. Sin embargo, el tratamiento con LY sigue un patrón de activación de estas dos caspasas diferente. LY promueve principalmente la activación de caspasa-9, siendo minoritaria la activación de caspasa-8. Curiosamente el tratamiento con LY induce mayores niveles del fragmento proteolizado p43/p41 de caspasa-8, producto del primer evento proteolítico en el mecanismo de activación de caspasa-8 que tiene lugar en el DISC, que el tratamiento con CH11 (Fig. 12A).

También analizamos los niveles de c-FLIP_S y c-FLIP_L, reguladores de la activación de la caspasa-8, y la proteólisis de PARP en células HeLa tratadas conjuntamente con CH11 y LY o añadidos por separado durante diferentes periodos de tiempo y en presencia o en ausencia de suero (Fig. 12B).

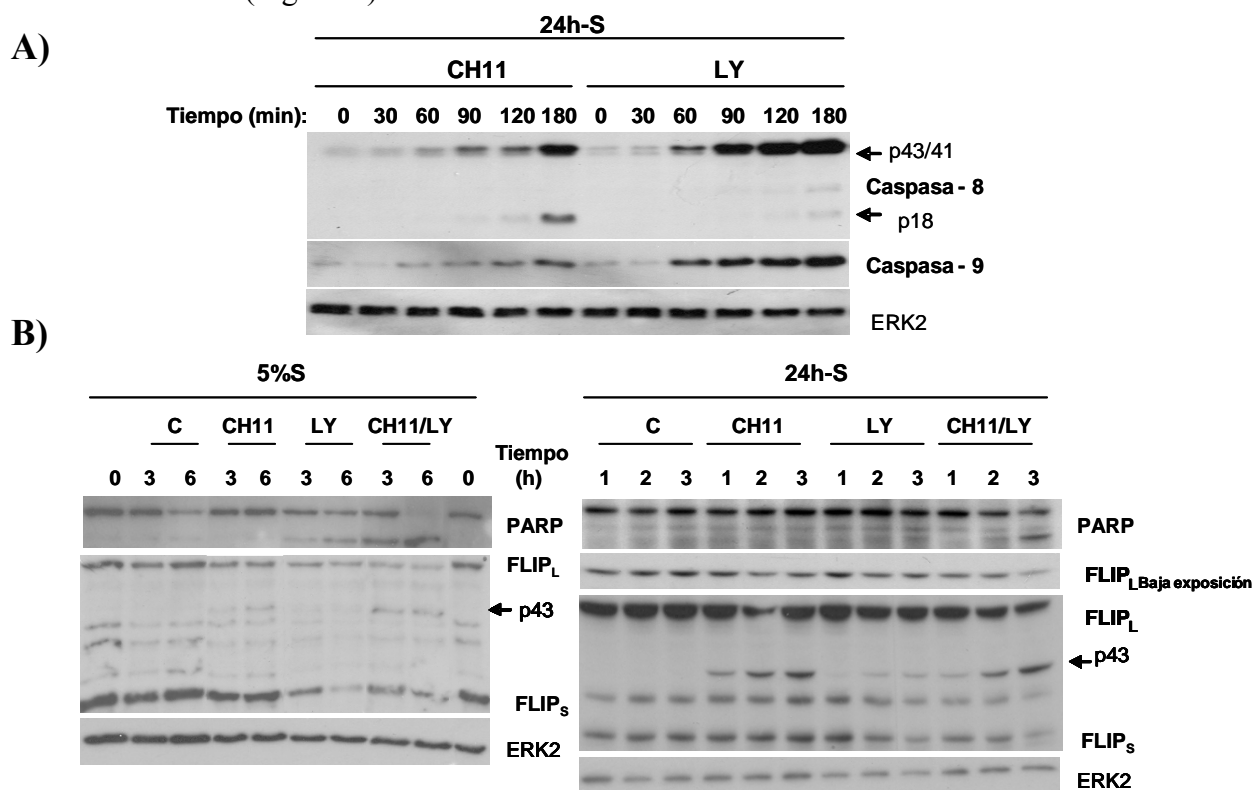


Fig 12. El tratamiento con LY o CH11 regula los niveles de caspasa-8 (p18) y caspasa-9 (p35) activas y regula los niveles de c-FLIP en células HeLa. (A) Células HeLa ayunadas de suero

durante 24 h se estimularon con CH11 (400 ng/ml) o LY (20 μ M) durante los tiempos indicados. Los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa-8, anti-caspasa-9 y anti-ERK 2 como control de carga. **(B)** Células HeLa mantenidas en medio 5% suero (5%S) o ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) se estimularon con CH11 (400 ng/ml) o LY (20 μ M) o conjuntamente con ambos estímulos durante los tiempos indicados. Los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot con los anticuerpos anti-FLIP, anti-PARP y anti-ERK 2 como control de carga. **(A, B)** Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes.

Como se observa en la figura 12B, y en concordancia con los datos mostrados en la figura 2, en células HeLa ayunadas de suero se invierte la relación c-FLIP_L/c-FLIP_S. El tratamiento con LY o CH11 en células HeLa mantenidas en medio con o sin 5% suero durante los tiempos indicados promueve una ligera disminución en los niveles de c-FLIP_L, sin embargo únicamente el tratamiento con LY promueve una disminución en los niveles de c-FLIP_S y la proteólisis de PARP (Fig. 12B) en la ventana de tiempo analizada. La adición simultánea de ambos estímulos tanto en ausencia o presencia de 5% suero en el medio, produce una mayor disminución de c-FLIP_L y de c-FLIP_S correlacionándose con un aumento en el procesamiento de PARP.

La forma proteolizada de c-FLIP_L p43, que es dependiente de la actividad de caspasa-8 y de la presencia de c-FLIP_L en el DISC (Krueger, 2001), se detecta con claridad tras la estimulación con CH11 en ausencia de suero. El tratamiento con LY también promueve la generación de p43 c-FLIP_L, aunque en menor proporción que CH11; estos datos sugieren que el tratamiento de células HeLa con LY también promueve asociación de c-FLIP_L al DISC (Fig. 12A).

Los datos obtenidos reflejan que en células HeLa los niveles de c-FLIP_S correlacionan con la sensibilización a apoptosis mediada por Fas, aunque la bajada en los niveles de c-FLIP_L también contribuye a dicha sensibilización. En el tratamiento con LY, la disminución de los niveles de c-FLIP_S parece ser también importante para el control de la activación de caspasa-8.

Para analizar este aspecto, decidimos determinar la relevancia de la actividad de la caspasa-8 en la apoptosis inducida mediante el tratamiento con LY o CH11 utilizando del inhibidor de caspasa-8 z-IETD. Como era previsible, la inhibición de caspasa-8 previene la acumulación de los fragmentos p43/41 y p18 de caspasa-8 así como de la forma proteolizada de c-FLIP_L p43, ambas dependientes de la actividad caspasa-8, en células HeLa estimuladas

con LY o CH11 (Fig. 13A). La preincubación con el inhibidor de caspasa-8 previene la activación de la caspasa-9 inducida por CH11 (Fig. 13A), indicando que la activación de caspasa-9 es dependiente de la activación de caspasa-8. Además, la inhibición de caspasa-8 previene completamente la apoptosis inducida por CH11 (Fig. 13B).

En contraste con los datos obtenidos con CH11, en el tratamiento con LY, la inhibición de la actividad de caspasa-8 no afecta a la activación de caspasa-9 promovida por LY (Fig. 13A) indicando que la generación de caspasa-9 activa mediada por LY es independiente de la activación de caspasa-8. Sin embargo, el hecho de que la apoptosis inducida por LY en células HeLa ayunadas de suero durante 24 h en presencia de z-IETD se reduzca en un 60% (Fig. 13C) indica que la caspasa-8 también juega un papel relevante en la apoptosis promovida por la inhibición de Akt.

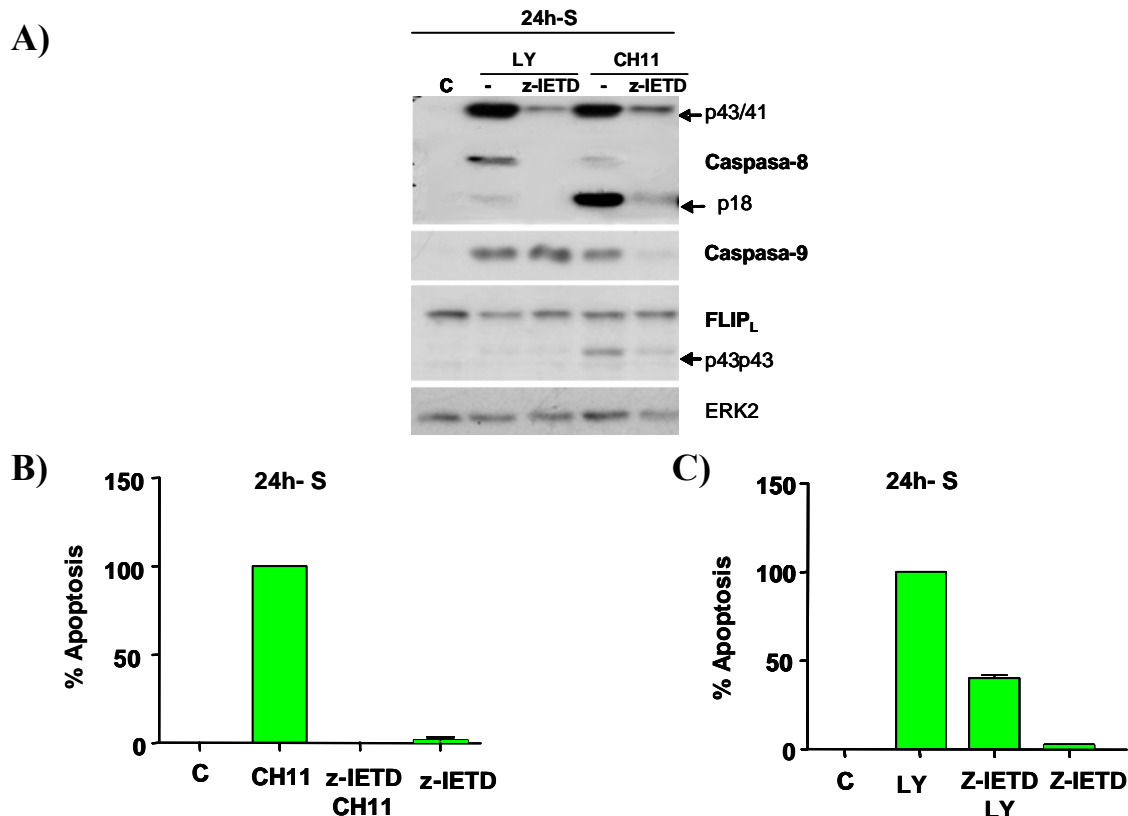


Fig. 13. Implicación de la actividad caspasa-8 en la apoptosis inducida por LY o CH11 en células HeLa. Células HeLa ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) se preincubaron durante 30 min con el inhibidor de caspasa-8, z-IETD-fmk (z-IETD, 2,2 μ M) y posteriormente se estimularon con LY (20 μ M) o CH11 (400 ng/ml) durante 15 h. **(A)** Los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa-8, anti-caspasa-9, anti-FLIP y anti-ERK 2 como control de carga. Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes. **(B)** Porcentaje de células HeLa apoptóticas analizado mediante citometría de flujo, otorgándose el valor

100% de apoptosis al valor obtenido al tratar con LY. (C) Porcentaje de células HeLa apoptóticas analizado mediante citometría de flujo, otorgándose el valor 100% de apoptosis al valor obtenido al estimular con CH11. (B, C) La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos.

5. Clasificación de células HeLa como tipo II en la muerte mediada por Fas

La activación de caspasa-9 inducida en células HeLa en ausencia de suero con CH11 es dependiente de la actividad caspasa-8. Estos datos sugerían la clasificación de las células HeLa como tipo II en las que, tras la activación de caspasa-8, se produce la activación de la caspasa-9, efectora de apoptosis, mediante la vía mitocondrial. Para determinar la implicación de la mitocondria en la apoptosis obtenida al estimular células HeLa en ausencia de suero con CH11, se analizó el efecto de la expresión ectópica del factor anti-apoptótico Bcl-2. También se analizó el efecto de Bcl-2 en la apoptosis inducida por LY en las células HeLa ayunadas de suero.

En las células HeLa ayunadas de suero que expresan Bcl-2 ectópico se reduce un 30% la apoptosis tras la estimulación con CH11 (Fig. 14A). Estos datos permiten la clasificación de las células HeLa como tipo II que indican la implicación de la mitocondria. Cuando las células HeLa ayunadas son estimuladas con LY, la expresión de Bcl-2 ectópico reduce un 70% la apoptosis inducida por LY lo que indica que la apoptosis mediada por este estímulo se produce vía mitocondria (Fig 14B).

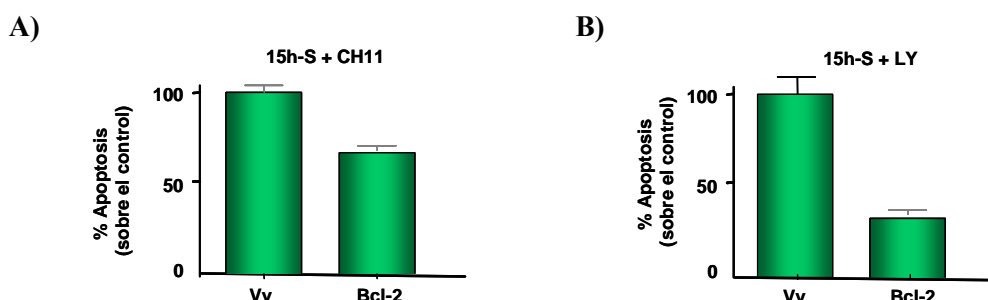


Fig. 14. Implicación de la vía mitocondrial en la apoptosis inducida por CH11 en células ayunadas de suero. Células HeLa co-transfectadas con PBB14-GFP (4 μ g) y vector vacío (Vv, 10 μ g), o con PBB14-GFP (4 μ g) y SFFV-Bcl-2 (Bcl-2, 10 μ g) fueron ayunadas de suero a la vez que se les añadió el tratamiento que se mantuvo durante 15 h (15h-S + estímulo). El porcentaje de células apoptóticas se determinó tras seleccionar mediante citometría de flujo la población de células que expresaban la proteína GFP otorgándose el valor 100% de apoptosis al valor obtenido al estimular con (A) CH11 (400 ng/ml) o con (B) LY (20 μ M). (A, B) Las gráficas muestran la media \pm SD de tres experimentos.

6. El ayuno de suero y el tratamiento con LY sensibilizan a apoptosis mediada por Fas a células BxPC3, pero no a células AsPC1.

Para determinar si la sensibilización por ayuno de suero a la apoptosis inducida por Fas es una particularidad de las células HeLa, analizamos la posible sensibilización a apoptosis mediada por Fas de otras dos líneas celulares. Las líneas humanas de cancer pancreático, AsPC1 y BxPC3 que son, como las células HeLa, resistentes a la apoptosis inducida por Fas en presencia de suero en el medio.

Las células BxPC3, al igual que las células HeLa, se sensibilizan a apoptosis inducida por Fas mediante ayuno de suero. La inhibición de la fosforilación de ERK 1/2 mediante el inhibidor UO, no produce apoptosis ni sensibiliza a la producida por estimulación con CH11. Tampoco la inhibición de la fosforilación de Akt mediante LY (20 μ M) (Fig. 15B), a diferencia de lo observado en células HeLa promueve apoptosis en presencia de 10% suero (Fig. 15A). Sólo tras 24 h de ayuno se observa un pequeño porcentaje(10%) de apoptosis tras el tratamiento con LY. Sin embargo, cuando se tratan las células simultáneamente con LY y CH11 observamos que el tratamiento con LY, sensibiliza significativamente a las células BxPC3 a la apoptosis inducida por CH11 tanto en presencia como en ausencia de 10% suero en el medio.

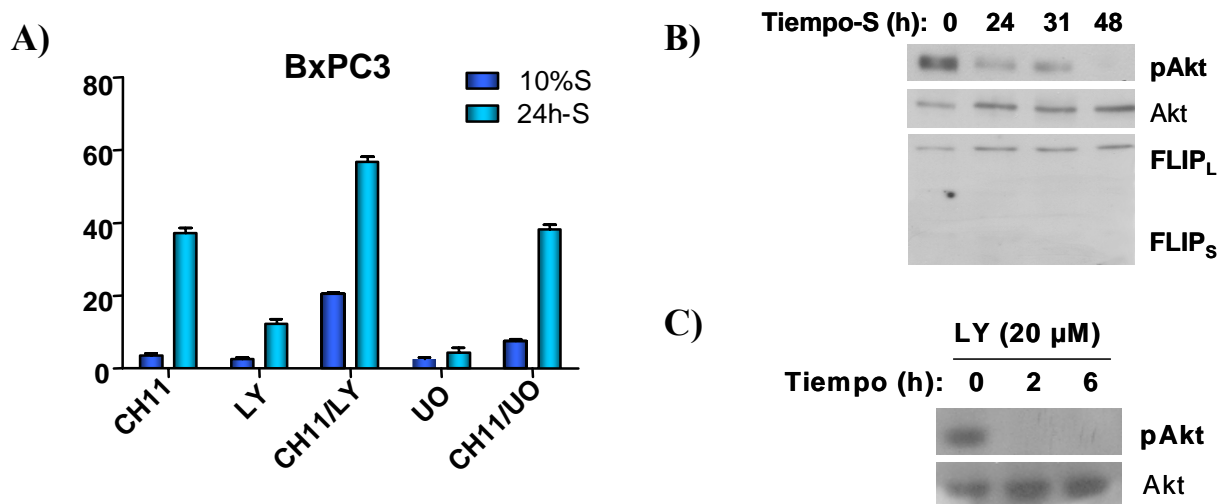


Fig. 15. La disminución de la actividad Akt sensibiliza a células BxPC3 a apoptosis mediada por Fas. (A) Células BxPC3 mantenidas en medio con 10% suero o ayunadas de suero durante 24h se trataron durante 30 min con LY (20 μ M) o UO (10 μ M) y posteriormente se estimularon o no con CH11 (400 ng/ml) durante 15 h. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media \pm SD de cuatro experimentos. **B)** Células BxPC3 en presencia de 10% suero se ayunaron de suero durante los tiempos indicados. **C)** Células BxPC3 en

presencia de 10% suero se trataron con LY (20 μ M) durante los tiempos indicados. **(B, C)** Los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-pAkt, anti-FLIP y anti-Akt como control de carga. Se muestran datos representativos de al menos tres ensayos diferentes.

Tras observar que el ayuno también sensibiliza a las células BxPC3 a apoptosis mediada por Fas, decidimos determinar si la privación de suero, al igual que en células HeLa, regula la expresión de c-FLIP así como el estado de fosforilación de Akt. En células BxPC3 los niveles de c-FLIP_S resultan prácticamente indetectables tanto en presencia como en ausencia de 10% suero en el medio y no se detecta variación en los niveles de c-FLIP_L tras el ayuno de suero (Fig. 15B). Los niveles de Akt fosforilado, igual que sucede en las células HeLa, también disminuyen con el ayuno (Fig. 15B) y se eliminan por completo con el tratamiento con LY (20 μ M) (Fig. 15C).

En células BxPC3 ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) la activación de las caspasas, al igual que en células HeLa, difiere según el tratamiento utilizado. Tras la estimulación de las células BxPC3 con CH11 se observa, en la ventana de tiempo estudiada, generación de los fragmentos de caspasa-8 y caspasa-9 activas así como proteólisis de PARP (Fig.16B). Cuando se tratan con LY, durante el mismo periodo de tiempo, no se detecta activación de ninguna de las caspasas ni la proteólisis de PARP (Fig. 16B) en correlación con los bajos niveles de apoptosis inducida por este estímulo (Fig. 15A).

Con respecto a c-FLIP, en presencia de 10% suero se observa disminución significativa de los niveles de c-FLIP_L únicamente cuando las células BxPC3 son tratadas simultáneamente con CH11 y LY, aunque la forma proteolizada de c-FLIP_L p43/41 aparece con la estimulación con CH11 independientemente de la ausencia o presencia de LY (Fig. 16A). En ausencia de suero, la estimulación con CH11 induce una clara disminución en los niveles de c-FLIP_L y la aparición de su forma proteolizada c-FLIP_L p43, que se incrementa cuando la estimulación es con CH11 y LY simultáneamente; con LY no se detectan cambios significativos en los niveles de c-FLIP_L (Fig. 16B).

El tratamiento simultáneo con CH11 y LY tanto en presencia como ausencia de suero, promueve un aumento significativo de la población de células apoptóticas (Fig. 15A), así como un aumento considerable de la activación de caspasa-8, de caspasa-9 y de los niveles de PARP proteolizado.

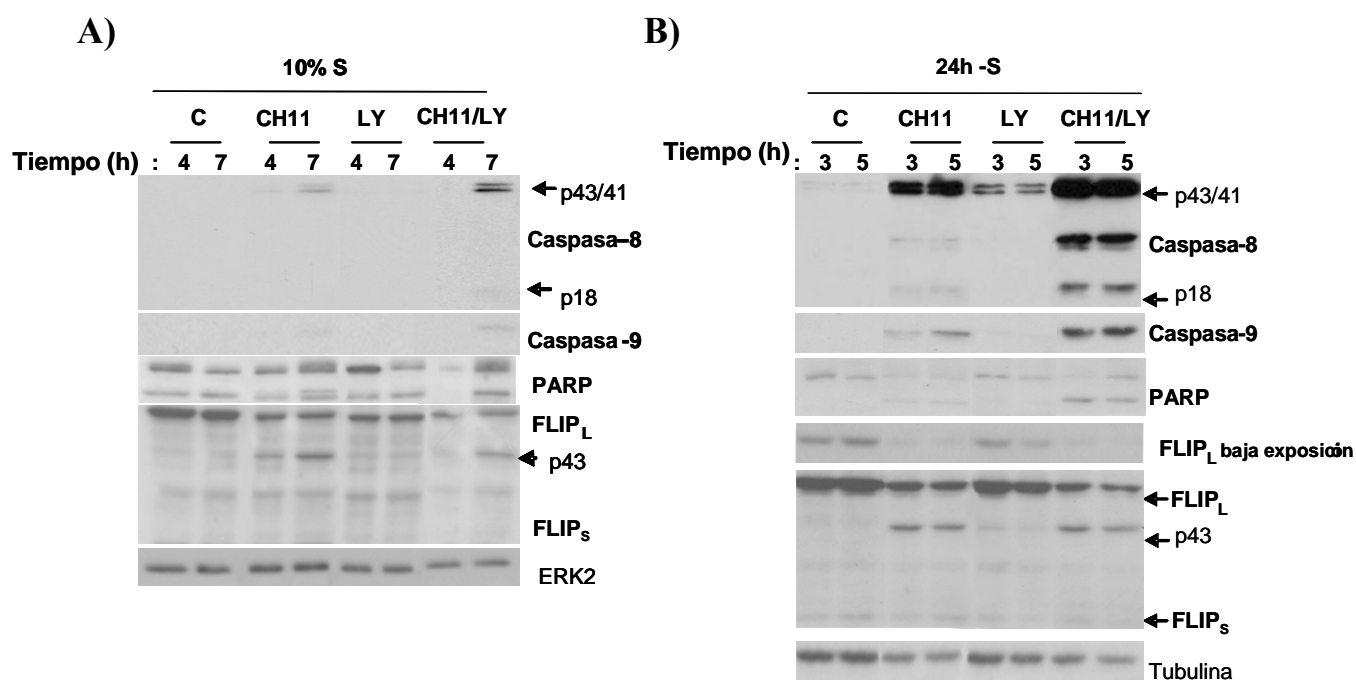


Fig. 16. Akt regula la activación de caspasa-8 y caspasa-9 y los niveles de c-FLIP_L de células BxPC3. Células BxPC3 **(A)** en presencia de suero o **(B)** ayunadas de suero durante 24 h, se estimularon los tiempos indicados con CH11 (400 ng/ml), LY 20 μ M o con ambos estímulos simultáneamente. Los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa-8, anti-caspasa-9, anti-FLIP, anti-PARP y anti-ERK-2 o anti-tubulina como control de carga. **(A, B)** Se muestran datos representativos de al menos tres ensayos diferentes.

Con la finalidad de determinar la relevancia de la caspasa-8 en la apoptosis inducida por CH11 en células BxPC3 ayunadas, analizamos la apoptosis producida tras 15 h de tratamiento en presencia o ausencia del inhibidor de caspasa-8 z-IETD. Como era de esperar la inhibición de caspasa-8 previene, tras la estimulación con CH11, la acumulación del fragmento p43/41 de caspasa-8. También se previene la aparición de las formas activas de caspasa-8 y de caspasa-9 (Fig. 17A). El porcentaje de inhibición en la generación de células

apoptóticas obtenida en presencia del inhibidor z-IETD al estimular CH11 es de un 75% (Fig. 17B).

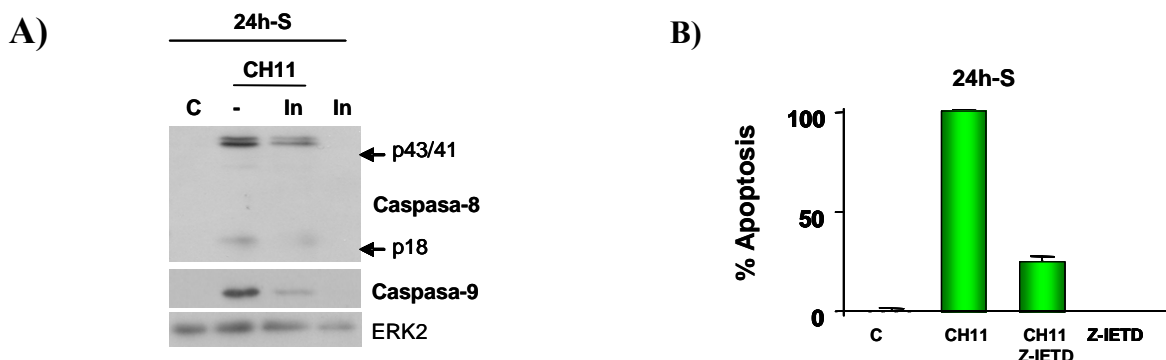


Fig. 17. Regulación de la apoptosis por el inhibidor de caspasa 8 z-IETD en células BxPC3 estimuladas con LY o CH11. Células BxPC3 ayunadas de suero durante 24 h (24h-S) se trataron con CH11 (400 ng/ml), con z-IETD (2,2 μM) o conjuntamente preincubando en este caso durante 30 min con z-IETD, durante 15 h. **(A)** Los lisados celulares (30 μg) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa-8, anti-caspasa-9, anti-FLIP y anti-ERK 2 como control de carga. Se muestran datos representativos de al menos tres ensayos diferentes. **(B)** El porcentaje de células apoptóticas se analizó mediante citometría de flujo tomando como valor 100% de apoptosis al obtenido con CH11. La gráfica muestra la media ± SD de tres experimentos.

Las células AsPC1 son resistentes, independientemente de la presencia o ausencia de 10% suero en medio, a la apoptosis inducida por CH11. Tampoco los tratamientos con LY (20 μM) (Fig. 18B), UO (10 μM) o los tratamiento de CH11 junto con LY y de CH11 junto con UO promueven apoptosis en esta línea celular (Fig. 18A) . En ninguna condición ni con ningún tratamiento se genera actividad caspasa-8.

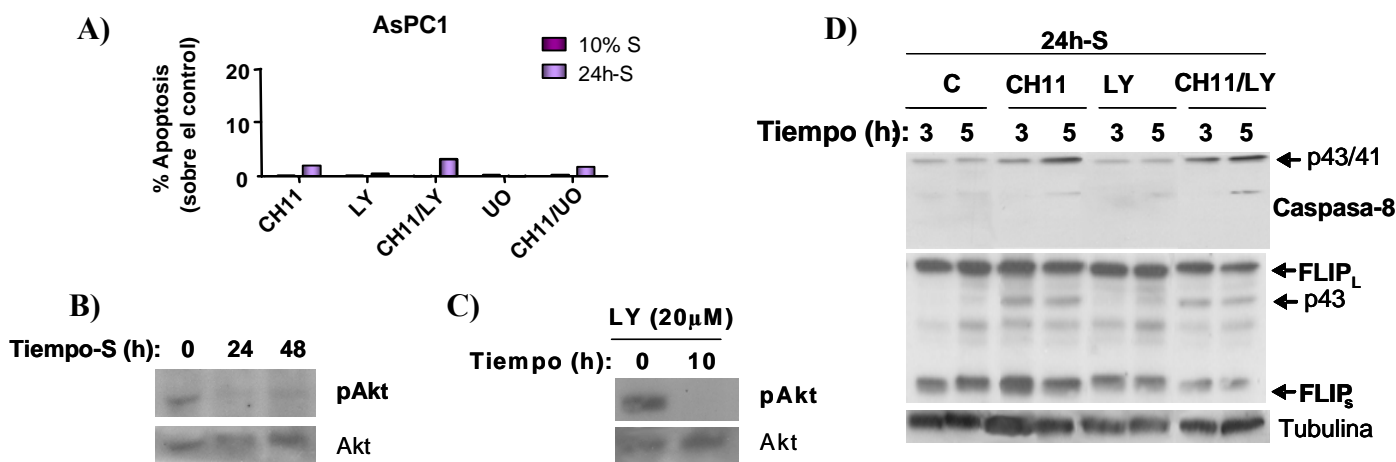


Fig. 18. Las células AsPC1 son resistentes a apoptosis inducida por CH11 en presencia o ausencia de suero e independientemente del tratamiento con LY o UO. A) Células AsPC1

mantenidas en medio con 10% suero o ayunadas de suero durante 24 h se trataron con CH11(400 ng/ml) y con LY (20 μ M) o UO (10 μ M) en ausencia o presencia de CH11; en los casos de coestimulación los inhibidores se añadieron 30 min antes de la adición del CH11. Tras 15 h de tratamiento el porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos. **B)** Células AsPC1 en presencia de 10% suero se ayunaron durante distintos tiempos o **C)** se trataron con LY (20 μ M) durante los tiempos indicados. **(B, C)** Los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-pAkt, y anti-Akt como control de carga. Se muestran datos representativos de al menos tres ensayos diferentes.

7. En células HeLa y AsPC1 c-FLIP_S es el principal freno para la activación de caspasa-8 mientras que en las células BxPC3 es c-FLIP_L.

Está bien establecido que la cicloheximida (CHX), inhibidor de la síntesis proteica, sensibiliza a las células a apoptosis mediante receptores de muerte debido a su capacidad de bloquear la síntesis de c-FLIP. Las células HeLa, AsPC1 y BxPC presentan cada una diferentes niveles de expresión de c-FLIP_L y c-FLIP_S y también distintas relaciones entre ellas. Decidimos analizar la sensibilización a apoptosis inducida por Fas en células en las que, mediante el uso de CHX, se inhibiera la síntesis de c-FLIP.

Las células HeLa mantenidas en medio con 5% suero presentan un mayor nivel de c-FLIP_S en relación con los de c-FLIP_L. En estas células el tratamiento con CHX induce un descenso en los niveles de c-FLIP_L y la completa desaparición de c-FLIP_S. Sin embargo, la disminución en los niveles de ambas formas de c-FLIP no induce la activación de caspasa-8 ni caspasa-9 (Fig. 19A) así como tampoco la proteólisis de PARP en el tiempo analizado (4 h).

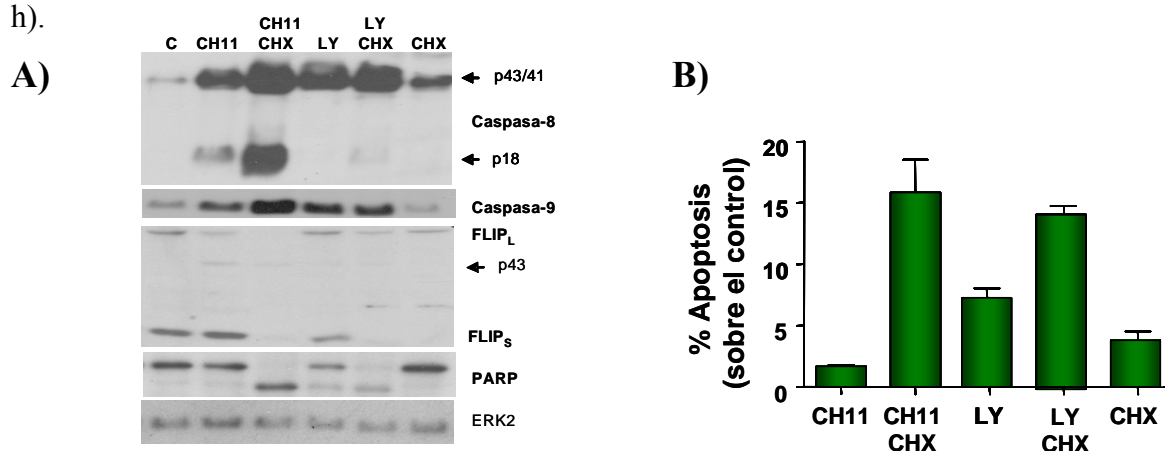


Fig. 19. El tratamiento con CHX sensibiliza a células HeLa en presencia de 5% suero a apoptosis inducida por CH11. Células HeLa mantenidas en medio con 5% suero fueron estimuladas

con CHX (10 μ M), CH11 (400 ng/ml), LY (20 μ M) o con CHX junto con CH11 o CHX junto con LY. **(A)** Tras 4 h de estímulo los lisados celulares (40 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa-8, anti-caspasa-9, anti-PARP, anti-FLIP y anti-ERK 2 como control de carga. Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes. **(B)** Tras 6 h de estimulación las células se analizaron mediante citometría de flujo y se determinó el porcentaje de células apoptóticas. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos.

Al estimular células HeLa en presencia de 5% con CH11 junto con CHX se incrementa la apoptosis de forma significativa (Fig. 19B) y se produce un drástico aumento de la activación de caspasa-8 y caspasa-9, la proteólisis total de PARP y la desaparición de ambas formas de c-FLIP. El hecho de que la adición de CH11 en presencia de CHX , inhibidor de la síntesis de proteínas, promueve una disminución de los niveles de c-FLIP_L sugiere que el CH11 acelera la degradación de c-FLIP_L.

La estimulación de células HeLa en presencia de 5% suero con LY promueve una disminución en los niveles de c-FLIPs, la activación de caspasa-9, proteólisis de PARP (Fig. 19A) y la inducción de apoptosis (Fig. 19B). La adición conjunta de CHX y LY produce una clara bajada en los niveles de ambas formas de c-FLIP e induce una ligera activación de la caspasa-8 en paralelo con un incremento de la proteólisis de PARP y de la apoptosis con respecto a la obtenida con el LY (Fig. 19A, 19B). Sin embargo, la activación de caspasa-9 no está incrementada.

En células BxPC3 mantenidas en medio con 10% suero la adición de CHX no induce variación en los niveles de c-FLIP_L así como tampoco la activación de caspasa-8 o caspasa-9 (Fig. 20A) ni la inducción de apoptosis (Fig. 20B). La adición de CH11 promueve una pequeña activación de caspasa-8 y caspasa-9. Cuando el tratamiento se realiza con CH11 junto con CHX se produce una disminución de los niveles de c-FLIP_L así como una activación significativa de caspasa-8, caspasa-9 (Fig. 20A) que va acompañada con la inducción de apoptosis (Fig. 20B).

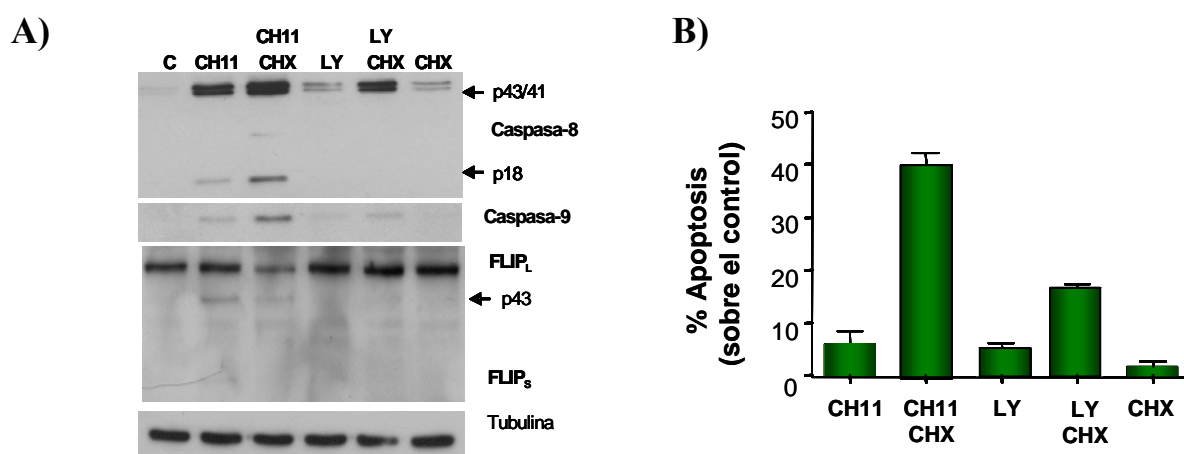


Fig. 20. En células BxPC3, el tratamiento con CHX sensibiliza a apoptosis inducida por la estimulación con CH11. Células BxPC3 mantenidas en medio con 10% suero se trataron con CHX (10 μ M), CH11 (400 ng/ml), LY (20 μ M) o conjuntamente con CHX y CH11 o con CHX y LY. **(A)** Tras 4 h de estímulo los lisados celulares (40 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa-8, anti-caspasa-9, anti-PARP, anti-FLIP y anti-ERK 2 como control de carga. Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes. **(B)** Tras 6 h de estimulación las células se analizaron mediante citometría de flujo y se determinó el porcentaje de células apoptóticas. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos.

El tratamiento con LY no produce en células BxPC3 variación de los niveles de c-FLIP_L ni tampoco en la activación de caspasa-8 (Fig. 20A), únicamente se detecta una leve activación de caspasa-9 y un pequeño porcentaje de apoptosis (Fig. 20B). Al realizarse el tratamiento con LY en presencia de CHX se detecta un ligero incremento en la activación de caspasa-9 (Fig. 20A), que se correlaciona con un porcentaje mayor de apoptosis que con cada estímulo por separado (Fig. 20B). A diferencia de lo observado en células HeLa, la activación de caspasa-9 por coestimulación con CHX y LY es independiente de la disminución de los niveles de c-FLIP_L que permanecen inalterados y de caspasa-8 (Fig. 20A). Estos datos indican que en células BxPC3 los niveles de c-FLIP_L juegan un papel relevante en la activación de caspasa-8.

En células AsPC1 mantenidas en medio con 10% suero la estimulación con CH11 no produce variación en los niveles de expresión de ninguna de las formas de c-FLIP ni tampoco produce la activación de caspasa-8 o caspasa-9. Al estimular con CH11 en presencia de CHX no se detecta la forma c-FLIP_S y no se aprecian variaciones significativas

en los niveles de c-FLIP_L. La disminución de los niveles de c-FLIP_S se correlaciona con una activación de caspasa-8 y caspasa-9 (Fig. 21A). Sin embargo, en células AsPC1, a diferencia de en células HeLa y BxPC3, la generación de caspasa-8 activa no es suficiente para promover apoptosis (Fig. 21B).

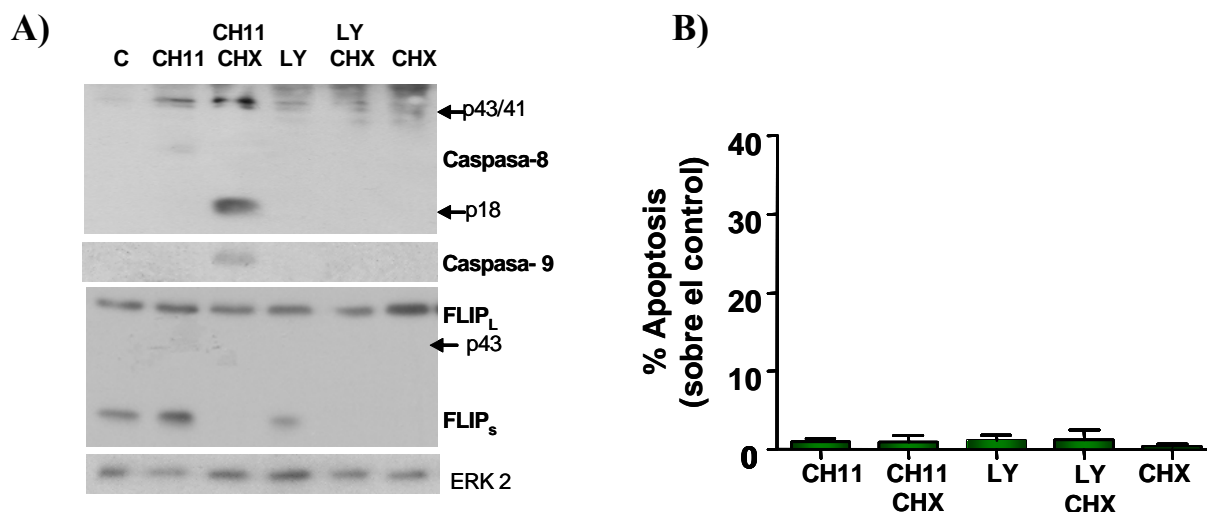


Fig. 21. Células AsPC1 son resistentes a apoptosis en presencia de CH11 junto con CHX o de LY junto con CHX. Células AsPC1 mantenidas en medio con 10% suero fueron estimuladas con CHX (10 μ M), CH11 (400 ng/ml), LY (20 μ M) o con CHX junto con CH11 o con CHX junto con LY. **(A)** Tras 4 h de tratamiento los lisados celulares (30 μ g) se analizaron mediante western blot utilizando los anticuerpos anti-caspasa-8, anti-caspasa-9, anti-PARP, anti-FLIP y anti-ERK 2 como control de carga. Se muestran datos representativos de tres ensayos diferentes. **(B)** Tras 6 h de tratamiento las células AsPC1 se analizaron mediante citometría de flujo y se determinó el porcentaje de apoptosis. La gráfica muestra la media \pm SD de tres experimentos.

En células AsPC1, el tratamiento con LY promueve disminución en los niveles de c-FLIP_S manteniendo intactos los de c-FLIP_L, esta disminución no va acompañada de activación de caspasa-8 ni caspasa-9, ni de la inducción de apoptosis. El tratamiento con LY en presencia de CHX, al igual que lo observado con CH11 y CHX, promueve una drástica caída en los niveles de c-FLIP_S pero no en los niveles de c-FLIP_L (Fig. 21A). Sin embargo, en este caso no se observa activación de caspasa-8 ni caspasa-9 (Fig. 21B).

DISCUSSION

DISCUSION

Los receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de los TNF, tras ser estimulados por sus correspondientes ligandos en el contexto adecuado, oligomerizan y promueven la señalización a muerte por apoptosis. Muchas células tumorales que expresan en su superficie receptores de muerte, son resistentes a la apoptosis que estos receptores señalizan; la determinación de los mecanismos mediante los que las células tumorales evitan esta apoptosis es un objetivo de gran relevancia para desarrollar estrategias anti-tumorales.

Las células HeLa, a diferencia de las Jurkat, son resistentes a apoptosis mediada por Fas en presencia de suero. Sin embargo, el ayuno de suero durante 24 h las sensibiliza y mueren por apoptosis tras ser estimuladas con anticuerpos agonísticos de Fas capaces de inducir trimerización de los receptores. La apoptosis detectada tras estimular las células ayunadas con CH11 es dependiente de dosis, lo que confirma la especificidad del estímulo. Además esta sensibilización no implica un aumento de los receptores Fas en superficie, ya que las células HeLa presentan un elevado nivel de expresión de Fas independientemente de la presencia o ausencia de suero. El ayuno de suero induce en las células HeLa la disminución de los niveles de pAkt, pERK 1/2 y c-FLIP_s.

Las líneas tumorales de adenocarcinoma pancreático BxPC3 y AsPC1 también son resistentes a apoptosis inducida por Fas en presencia de suero; sin embargo el ayuno sensibiliza a muerte por apoptosis únicamente a las células BxPC3.

Tanto en las células HeLa como en las células BxPC3, el ayuno de suero durante 24 h promueve una bajada en el estado de fosforilación de ERK 1/2. La MAPK ERK 1/2 ha sido implicada en crecimiento, diferenciación y supervivencia celular. En algunas líneas celulares, el descenso de los niveles de pERK 1/2 puede sensibilizar a apoptosis mediada por receptores de muerte. Mediante la utilización de UO126, inhibidor de la vía MEK 1-ERK 1/2, se ha descrito que en células HeLa la forma fosforilada y activa de ERK 1/2 protege de apoptosis mediada por TRAIL (Lee, 2005). En líneas celulares de tiroides y células T activadas, la inhibición de MEK 1/2 mediante el uso de inhibidores específicos como PD098059 o UO126, aumenta la apoptosis mediada por Fas (Holmström, 1999; Mezosi, 2005). Además el incremento de los niveles de pERK 1/2 obtenido tanto en células NIH3T3 mediante la expresión ectópica de la proteína I2^{PP2A}, inhibidor de la proteína fosfatasa 2A; como en células U937 mediante transfecciones estables de MEK 1 activa, produce la inhibición de la apoptosis mediada por receptores de muerte (Harmala-Brasken, 2003).

Un mecanismo descrito para la regulación de la apoptosis por vía extrínseca mediada por la actividad ERK 1/2 es el control de la expresión de la proteína c-FLIP. El tratamiento en células Jurkat y en las líneas de cáncer de colon: HT29 y DLD con PD098059, inhibidor de ERK 1/2, promueve una reducción en los niveles de c-FLIP (Yeh, 1998; Panka, 2001).

También se ha propuesto que ERK 1/2 puede ejercer un papel protector de la apoptosis intrínseca mediante la regulación de la expresión de genes implicados en apoptosis. En las células pancreáticas MIA PaCa-2 la actividad ERK 1/2 promueve supervivencia celular promoviendo la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 (Boucher, 2000). En las células HeLa la actividad de ERK 1/2 no parece estar implicada en la regulación ni de los niveles de Bcl-2 ni de los de Bcl-X_L ya que el ayuno de suero, a pesar de disminuir los niveles de pERK 1/2, no induce variaciones en los niveles de estas proteínas anti-apoptóticas.

A pesar de todas las evidencias descritas sobre el papel de ERK 1/2 en la prevención de apoptosis, nuestros datos indican que en células HeLa la actividad de ERK 1/2 no tiene un papel protector relevante ni en la apoptosis inducida por Fas ni en la inducida por LY. El tratamiento con UO126, inhibidor de MEK 1, a concentraciones que bloquean completamente la actividad de ERK 1/2, no produce incrementos significativos en la apoptosis tras estimulación con CH11 en presencia o ausencia de suero. Tampoco en las células BxPC3 y AsPC1 la disminución de los niveles de pERK 1/2 sensibiliza a apoptosis inducida por Fas.

Además, el hecho de que tras la estimulación con anticuerpos agonísticos de Fas se detecte una rápida activación transitoria de ERK 1/2, independientemente de que el estímulo sea o no apoptótico o se lleve a cabo en presencia o ausencia de suero, nos hace descartar que la activación de ERK 1/2 en células HeLa sea relevante para la protección de la apoptosis promovida por Fas. Esta activación rápida de ERK 1/2 ha sido descrita tras la estimulación de varios receptores de muerte como FasR, TNF-R1 o TRAIL-R (Tran, 2001). Un posible mecanismo propuesto para la activación de ERK 1/2 tras la estimulación de receptores de muerte es el reclutamiento de Raf-1 que lleva a cabo c-FLIP tras su unión a Fas (principalmente c-FLIP_s) (Kataoka, 2000).

El ayuno de suero durante 24 h también produce una bajada en los niveles de pAkt en las tres líneas celulares estudiadas. La vía de PI3K/Akt es una de las principales vías de

supervivencia. Akt es una proteína quinasa que regula varias funciones, entre las que se encuentran el metabolismo de nutrientes, el crecimiento celular, la regulación transcripcional y la supervivencia celular en respuesta a factores de crecimiento y otros estímulos extracelulares.

Nuestros datos indican que el descenso en los niveles de pAkt inducidos por la privación de suero tiene un efecto diferente según la línea celular estudiada: HeLa, BxPC3 o AsPC1. De hecho, la capacidad que tiene la inhibición de pAkt para promover apoptosis varía según los mecanismos de resistencia de cada línea celular.

En células HeLa la inhibición de la vía PI3K/Akt mediante el tratamiento con LY, promueve apoptosis en presencia o ausencia de suero e independientemente de la estimulación con CH11. En células BxPC3 el tratamiento con LY, a concentraciones que inhiben completamente la actividad de Akt, no produce apoptosis de forma significativa ni en presencia ni en ausencia de suero, pero sensibiliza claramente a apoptosis inducida por CH11. Por otro lado, en células AsPC1 ayunadas de suero, la adición de LY no induce apoptosis ni en ausencia ni en presencia de CH11.

En células de leucemia linfocítica crónica, se ha descrito que el tratamiento con LY promueve apoptosis de forma dependiente de caspasa-8 pero independiente de Akt ya que los niveles de pAkt no disminuyen tras el tratamiento (Plate, 2004). Sin embargo, nuestros resultados descartan esta posibilidad ya que la expresión ectópica de la forma activa de Akt (Akt miristoilado) reduce drásticamente la apoptosis promovida por LY. Este resultado indica que la diana del inhibidor LY implicada en la inducción de apoptosis en células HeLa es Akt.

La bajada parcial de la actividad Akt obtenida en células HeLa mediante el tratamiento con bajas concentraciones de LY en presencia de suero, produce un efecto sinérgico en la inducción de apoptosis por la estimulación con CH11. De hecho, el efecto sensibilizador de la inhibición de Akt sobre la apoptosis inducida por Fas es más evidente con dosis bajas de LY ya que a dosis altas esta droga produce por sí misma altos niveles de apoptosis.

Por otro lado, la reducción en un 30% de la apoptosis mediada por Fas al expresar Akt miristoilada corrobora la implicación de la vía de Akt en la regulación de la apoptosis inducida por CH11 en células HeLa en ausencia de suero.

Los datos obtenidos con células HeLa nos llevan a proponer que la proteína quinasa Akt protege a estas células de apoptosis mediada por Fas mediante dos mecanismos diferentes. Uno de los mecanismos estaría relacionado con un evento temprano que ocurre tras la estimulación del receptor de muerte (posiblemente la formación del DISC). Esta propuesta se basa en la disminución rápida y transitoria observada en la actividad de Akt únicamente tras 24 h de ayuno y solamente cuando el estímulo es apoptótico (CH11). La disminución rápida de los niveles de pAkt se previene con el pre-tratamiento con IGF-1 (activador de la vía) correlacionando con una disminución en la inducción de apoptosis por CH11. En este sentido se ha descrito, en células de carcinoma hepatocelular, que HGF (Hepatocyte Growth Factor), que incrementa la actividad de Akt, impide la formación del DISC tras la estimulación con Fas disminuyendo la unión de pro-caspasa-8 al complejo formado por FADD y el receptor Fas (Suzuki, 2000). Asimismo, en células T, la expresión ectópica de Akt impide el reclutamiento de pro-caspasa-8 al DISC sin variaciones en los niveles de c-FLIP (Jones, 2002).

Nuestros datos indican que la ausencia de actividad Akt, incluso en presencia de suero, permite la formación de DISC aún en ausencia de estimulación del receptor de muerte, ya que al tratar las células con LY se generan los fragmentos p43/41 de caspasa-8 y p43 de c-FLIP_L; sin embargo, en el DISC formado, se genera de forma muy poco eficiente la subunidad p18. Estos datos indican que cada uno de los dos procesamiento de la pro-caspasa-8 necesita requisitos específicos. La conformación que adopta la pro-caspasa-8 tras el tratamiento con LY, además de permitir la aparición del fragmento p43/p41 de caspasa-8, en lugar de promover la generación de p18 parece favorecer la generación de un fragmento diferente al p43/41 de aproximadamente 30 KDa (Fig. 12A y 13A), que prácticamente no se detecta al estimular las células con CH11.

El segundo mecanismo de protección de Akt en la apoptosis mediada por Fas en células HeLa que proponemos, está relacionado con el control que esta proteína quinasa ejerce sobre los niveles de las proteínas c-FLIP.

La proteína c-FLIP es una proteína que se expresa mayoritariamente de dos formas diferentes c-FLIP_S y c-FLIP_L y es capaz de inhibir la generación de caspasa-8 activa

(Uriarte, 2005; Kondo, 2005; Suhara, 2001; Panka, 2001). Las dos formas de c-FLIP presentan dominios DED por lo que pueden ser reclutados al DISC interaccionando con FADD y compitiendo con pro-caspasa-8. Esta interacción impide que se recluten moléculas de pro-caspasa-8 y su posterior activación por lo que en un principio, actuarían como inhibidores de la activación de caspasa-8 (Irmeler, 1997; Yeh, 1998).

La función anti-apoptótica de c-FLIP_S está claramente establecida; se ha propuesto que en el heterodímero que forma con pro-caspasa-8 en el DISC c-FLIP_S inhibe los dos procesamiento necesarios para la activación de caspasa-8 (Krueger, 2001). Sin embargo a c-FLIP_L se le han atribuido funciones tanto pro- como anti-apoptóticas. Mediante la utilización de RNAs de interferencia, que disminuyen los niveles de c-FLIP_L, se está asentando su papel anti-apoptótico (Wilson, 2007; Wang, 2007). Para explicar el papel anti-apoptótico de c-FLIP_L se ha propuesto que esta proteína se asocia con pro-caspasa-8 en el DISC, esta interacción permite que la pro-caspasa-8 adopte una conformación que presenta cierta actividad catalítica. La pro-caspasa-8 catalíticamente activa, proteoliza tanto a c-FLIP_L, originando los fragmentos p43 y p12, como a sí misma, generando los fragmentos de caspasa-8 p43/41 y p10. El fragmento de c-FLIP_L p43 y el de caspasa-8 p43/41 permanecen unidos al DISC, pero como c-FLIP_L no presenta actividad trans-catalítica no se produce el segundo corte en trans necesario para generar la subunidad p18 y generar caspasa-8 activa (Krueger, 2001). Se impide además la asociación a los receptores de nuevas moléculas de pro-caspasa-8 para ser activadas. Micheau propone que la pro-caspasa-8 catalíticamente activa actúa sobre el c-FLIP_L y sobre otros sustratos, como la quinasa RIP, en la proximidad del DISC (Micheau, 2002), mediando así otras funciones diferentes a apoptosis en las que se ha implicado a estos receptores de muerte.

En las células HeLa, la forma c-FLIP mayoritariamente expresada es c-FLIP_S, nuestros datos indican que esta forma de c-FLIP representa el principal freno para prevenir la apoptosis mediada por Fas. El ayuno de suero produce, al igual que el tratamiento con LY, la disminución de la actividad de Akt y además una drástica disminución de los niveles de c-FLIP_S que conduce a que la relación c-FLIP_L/c-FLIP_S se invierta. Estos datos sugieren que, en presencia de 5% suero, la actividad Akt mantiene altos los niveles de c-FLIP_S, previniendo apoptosis. En concordancia con esta hipótesis conviene resaltar que el tratamiento con CHX de células HeLa en presencia de 5% suero induce la desaparición de c-FLIP_S y sensibiliza a las células a apoptosis inducida por CH11.

Al igual que en células HeLa, se han descrito otras líneas celulares en las que c-FLIP_S actúa como el principal bloqueo en la inducción de apoptosis mediada por receptores de muerte y sus niveles se encuentran regulados por la actividad de la proteína quinasa Akt. En las células de cáncer gástrico humano SNU-216 una actividad Akt elevada se corresponde con altos niveles de c-FLIP_S y con la resistencia a apoptosis inducida por TRAIL. En estas células el mantenimiento de los niveles de c-FLIP_S está regulado por Akt como indica la disminución de los niveles de c-FLIP_S que se produce tras el tratamiento con LY. La inhibición de la actividad Akt produce además la sensibilización a apoptosis inducida por TRAIL (Nam, 2003). También en linfocitos T, la apoptosis inducida por Fas es bloqueada principalmente por c-FLIPs cuyos niveles son regulados por la actividad de Akt. El tratamiento de los linfocitos T durante 24 h con LY o con AI-III o SH-5, inhibidores específicos de Akt, además de inducir apoptosis sensibilizan a la apoptosis inducida por Fas (Uriarte, 2005; Starck, 2005).

Al contrario de lo que sucede con c-FLIP_S, en células HeLa la disminución de la actividad Akt mediante el ayuno de suero o el tratamiento con LY, no cambia significativamente los niveles de c-FLIP_L. Sin embargo se ha descrito que en células endoteliales, en las que los niveles de c-FLIP_S son indetectables, la actividad de Akt es capaz de regular los niveles de c-FLIP_L controlando así la apoptosis inducida por Fas (Suhara, 2001). En células HeLa los niveles de c-FLIP_L únicamente disminuyen tras la estimulación con CH11 en condiciones de ayuno siendo aún mayor la bajada cuando se bloquean por completo los niveles de pAkt mediante el tratamiento con LY.

Aunque el papel regulador de Akt sobre los niveles de c-FLIP está bien establecido existe cierta controversia sobre la isoforma de c-FLIP sobre la que Akt ejerce el control. Nuestros datos indican que en células HeLa Akt está implicada en el mantenimiento de c-FLIP_S, pero existen varios trabajos en la literatura, en los que no se especifica la isoforma de c-FLIP que disminuye tras el tratamiento con LY (Panka, 2001; Kondo, 2005).

Cuando ambas formas de c-FLIP están disminuidas, la estimulación de células HeLa con CH11 promueve la activación de caspasas-8 y 9. La actividad de caspasa-9, así como la apoptosis obtenida tras la estimulación con CH11, depende de la actividad de caspasa-8 como indican los experimentos realizados con el inhibidor z-IETD. Este resultado, junto a la reducción significativa de la apoptosis inducida por CH11 al expresar el factor anti-apoptótico Bcl-2 ectópico, nos lleva a clasificar las células HeLa como tipo II, en las que la activación de caspasa-9 sucede vía mitocondrial tras la activación de la caspasa-8 mediante receptores de muerte. Otras células de tipo II son las líneas celulares de linfocitos T: Jurkat y

CEM; en estas células la cantidad de DISC originado es escasa y la mitocondria actúa como un amplificador de la señal para conseguir la activación de la caspasa-9 y la caspasa-3 (Scaffidi, 1998).

El tratamiento de células HeLa con el inhibidor LY, tanto en presencia como en ausencia de suero, produce una rápida activación de caspasa-9. Sin embargo los niveles de caspasa-8 activa generada tras la estimulación en las mismas condiciones son mucho menores que los de caspasa-9. Curiosamente la aparición del fragmento proteolítico de caspasa-8 p43/41 sí que se correlaciona con la aparición de caspasa-9 activa. El hecho de que la activación de caspasa-9 ocurra previamente a la activación de caspasa-8 se confirma al comprobar que la inhibición de la actividad de caspasa-8 con el inhibidor z-IETD no impide la activación de caspasa-9. La prevención de hasta el 60% de la apoptosis mediada por LY que obtenemos al tratar las células con el inhibidor de caspasa-8, sugiere la existencia de un loop en el que la actividad de caspasa-9 generada vía mitocondria por el tratamiento con LY podría estar implicada en la generación de más caspasa-8 activa. Viswanath et al (Viswanath, 2001) han mostrado que en la apoptosis mediada por 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) en células PC12, la activación de caspasa-9, sucede a las 2 h y precede a la activación de caspasa-8 que se observa 10 h más tarde; por otro lado Yang et al (Yang, 2006), estudiando apoptosis mediada por TNF α en células derivadas de MCF-7, proponen que en estas células se genera un loop de activación de caspasa-8 mediado por la caspasa-9 y la caspasa-3.

Además del papel de Akt en la regulación de la apoptosis vía extrínseca, está bien establecido el papel de Akt en la prevención de la apoptosis vía intrínseca. Akt regula la vía mitocondrial mediante la inactivación de proteínas pro-apoptóticas, la activación de proteínas anti-apoptóticas implicadas en esta vía o mediante la regulación de la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (Pugazhenth, 2000). Varios de los mecanismos descritos que explican los efectos de supervivencia de Akt son: la fosforilación e inactivación en el citoplasma de Bad y de los factores de transcripción Forkhead (implicados en la expresión de proteínas pro-apoptóticas) o la fosforilación y bloqueo del procesamiento de pro-caspasa-9 (Song, 2005). En células HeLa la disminución de los niveles de pAkt producido en el ayuno de suero durante 24 h no se corresponde con una disminución ni de los niveles de pBad ni de los de Bcl-2 por lo que descartamos estos mecanismos para la protección a apoptosis que Akt ejerce en células HeLa.

Las células BxPC3, al igual que las células HeLa, se sensibilizan a apoptosis inducida por Fas mediante el ayuno de suero, que promueve una bajada considerable en los niveles de pAkt. El tratamiento con CH11 en ausencia de suero promueve 10 veces más apoptosis de la que se obtiene en presencia de suero; este dato sugiere que la bajada de pAkt obtenida por el ayuno de suero puede ser un factor esencial para la sensibilización a apoptosis. Esta sugerencia se corrobora ya que, con niveles de pAkt bajos (ayuno de suero) la adición de LY incrementa sólo 1.5 veces la apoptosis promovida por CH11, mientras que, con niveles de pAkt altos (presencia de suero) la adición de LY incrementa 5 veces la apoptosis. El hecho de que se incremente en tres veces el porcentaje de células apoptóticas obtenido tras el tratamiento conjunto de LY y CH11 en células ayunadas de suero, con respecto a las estimuladas en presencia de suero, indica que la depleción de suero sensibiliza a apoptosis por Fas mediante la regulación no solo de los niveles de pAkt sino también de otros eventos.

En células BxPC3 los niveles de c-FLIP_S son indetectables, siendo razonable pensar que la acción inhibitoria de c-FLIP recae en c-FLIP_L, cuyos niveles no varían con el ayuno de suero. De hecho la disminución de los niveles de c-FLIP_L que se produce tras el tratamiento con CHX junto CH11, se correlaciona con un incremento de 5 veces en la apoptosis obtenida en estas condiciones respecto a la observada por estimulación sólo con CH11. Por otro lado, al igual que en células HeLa y AsPC1 y a diferencia de lo observado con los niveles de c-FLIP_S, en las células BxPC3 la inhibición de la actividad Akt no es suficiente para disminuir los niveles de c-FLIP_L; su disminución requiere de la estimulación con CH11 en presencia de niveles de pAkt bajos bien por ausencia de suero o por el tratamiento con LY (comparar Fig. 16A, 16B y 20A). Correlacionando con la disminución de c-FLIP_L se produce la activación de caspasa-8 y caspasa-9 y consecuentemente el incremento en la apoptosis. En conjunto, los datos obtenidos sugieren que la retirada de suero, además de producir una bajada en los niveles de pAkt, está afectando a otro factor que es determinante para la caída en los niveles de c-FLIP_L promovida por CH11 y para que las células mueran por apoptosis.

Por otro lado, la diferencia en la capacidad de LY para inducir apoptosis en células HeLa y BxPC3 radica principalmente en la incapacidad de esta droga para generar caspasa-9 activa en las células BxPC3. Además, en estas células la capacidad de LY para reducir los niveles de c-FLIP_S es irrelevante ya que su nivel de expresión es indetectable y se encuentra

probablemente por debajo del umbral requerido para actuar como freno en la activación de caspasa-8.

En células AsPC1, el ayuno no produce sensibilización a la apoptosis inducida por ninguno de los tratamientos utilizados. Al igual que en células HeLa y BxPC3, la estimulación con CH11 no promueve variación en ninguna de las dos formas de c-FLIP. El tratamiento con CH11 únicamente es capaz de disminuir los niveles de c-FLIP_S y no los de c-FLIP_L y sólo cuando el tratamiento se realiza en ausencia de suero con LY o en presencia de suero con CHX. La caída en los niveles de c-FLIP_S es determinante para promover la activación de caspasa-8 y -9 inducida por CH11 como observamos tras el tratamiento con CH11 en presencia de CHX. La disminución parcial de c-FLIP_S producida tras la estimulación con CH11 más LY en ausencia de suero no es suficiente para permitir la activación de caspasa-8 por CH11; es posible que se requieran tratamientos más largos, para llegar a obtener la disminución necesaria para producir activación de caspasa-8. A diferencia de lo observado con CH11, el tratamiento con LY independientemente de los niveles de c-FLIP_S no promueve la activación ni de caspasa-8 ni de caspasa-9, indicando que al contrario de lo que ocurre en células HeLa, es necesaria la activación de la vía de muerte para llegar a la formación de DISC.

Por otro lado, en estas células, c-FLIP_L no parece estar implicado en el bloqueo de la activación de caspasa-8 como demuestran los resultados obtenidos tras el tratamiento conjunto de CHX con CH11 ya que, aun manteniéndose niveles altos de c-FLIP_L, la disminución total de c-FLIP_S es suficiente para promover la activación de caspasa-8 y caspasa-9.

Condiciones que llevan a la activación de caspasa-8 y caspasa-9 (CH11 más CHX), no son suficientes para promover apoptosis en células AsPC1. Recientemente se ha descrito la implicación de la proteína XIAP, inhibidor de la caspasa-3, caspasa-7 y caspasa-9, en la resistencia a apoptosis en células AsPC1 (Vogler, 2007). Nosotros no hemos observado diferencias significativas en los niveles de esta proteína en las tres líneas celulares estudiadas (datos no mostrados). Nuestros datos indican que los niveles de c-FLIP_S son determinantes para la prevención de la activación de la caspasa-8 y -9, pero es evidente que además están operando otros frenos detrás de estas caspasas entre los que puede encontrarse la proteína XIAP.

En conclusión, las diferentes líneas de células tumorales descritas como resistentes a apoptosis inducida por Fas, han generado diferentes mecanismos para evadirla. Por tanto las estrategias necesarias para inducir apoptosis en ellas han de ser diferentes. La privación de suero disminuye el estado de fosforilación de Akt y ERK 1/2, así como los niveles de c-FLIP_S. Nosotros mostramos que la privación de suero es una buena herramienta para sensibilizar células tumorales a la apoptosis inducida por Fas, especialmente en aquellas en las que c-FLIP_S representa el principal bloqueo en la generación de caspasa-8. Faltan por determinar otras señales específicas contenidas en el suero mediante las que se protege la apoptosis mediada por Fas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes extraídas del trabajo presentado son:

1. El ayuno de suero sensibiliza a las líneas celulares tumorales HeLa y BxPC3 a apoptosis inducida por Fas. La disminución de los niveles de pAkt que se produce en el ayuno de suero tiene un papel esencial en dicha sensibilización.
2. En células HeLa la actividad Akt regula negativamente un evento temprano de la señalización de Fas, probablemente la formación del DISC, además controla los niveles de c-FLIP_S y colabora con CH11, en la disminución de los niveles de c-FLIP_L. Por otro lado, el bloqueo total de la actividad Akt promueve apoptosis vía mitocondrial dependiente de caspasa-9.
3. En células BxPC3, con niveles de c-FLIP_S indetectables, el principal freno para la activación caspasa-8 es c-FLIP_L cuyos niveles no varían en ausencia de suero. El tratamiento con CH11 no promueve por si solo la bajada de los niveles de c-FLIP_L sino que requiere bien de la ausencia de suero o de la coestimulación con CHX o con LY.
4. En células AsPC1 únicamente se consigue activación de caspasa-8 y caspasa-9 tras la estimulación con CH11 cuando no se detectan niveles de c-FLIP_S, esta condición solo se consigue cuando el tratamiento se realiza junto con CHX y no con LY. A pesar de la activación de las caspasas no se detecta apoptosis.

BIBLIOGRAFIA

- Algeciras-Schimnich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K., and Peter, M. E.** (2002). Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22, 207-220.
- Bae, J., Leo, C. P., Hsu, S. Y., and Hsueh, A. J.** (2000). MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. *J Biol Chem* 275, 25255-25261.
- Bao, Q., and Shi, Y.** (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 14, 56-65.
- Battle, T. E., and Frank, D. A.** (2002). The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2, 381-392.
- Boatright, K. M., and Salvesen, G. S.** (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-731.
- Bonni, A., Brunet, A., West, A. E., Datta, S. R., Takasu, M. A., and Greenberg, M. E.** (1999). Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science* 286, 1358-1362.
- Boucher, M. J., Morisset, J., Vachon, P. H., Reed, J. C., Laine, J., and Rivard, N.** (2000). MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 79, 355-369.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S.** (2000). Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol Cell Biol* 20, 1886-1896.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Byun, D. S., Cho, K., Ryu, B. K., Lee, M. G., Kang, M. J., Kim, H. R., and Chi, S. G.** (2003). Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* 63, 7068-7075.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J. C.** (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318-1321.
- Cory, S., and Adams, J. M.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- Curtin, J. F., and Cotter, T. G.** (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 15, 983-992.

Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21, 3704-3714.

Chang, H. Y., and Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 821-846.

Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J. L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y. C., and Karin, M. (2006). The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover. *Cell* 124, 601-613.

Chanvorachote, P., Nimmannit, U., Wang, L., Stehlik, C., Lu, B., Azad, N., and Rojanasakul, Y. (2005). Nitric oxide negatively regulates Fas CD95-induced apoptosis through inhibition of ubiquitin-proteasome-mediated degradation of FLICE inhibitory protein. *J Biol Chem* 280, 42044-42050.

Chua, B. T., Guo, K., and Li, P. (2000). Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* 275, 5131-5135.

Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Wang, H. G., Tsang, B. K., and Cheng, J. Q. (2004). Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 279, 5405-5412.

Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.

Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S., and Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37, 719-727.

Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.

Fuentes-Prior, P., and Salvesen, G. S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232.

Fujita, E., Egashira, J., Urase, K., Kuida, K., and Momoi, T. (2001). Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop in vivo. *Cell Death Differ* 8, 335-344.

- Golks, A., Brenner, D., Fritsch, C., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N.** (2005). c-FLIPR, a new regulator of death receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 14507-14513.
- Harada, H., Quearry, B., Ruiz-Vela, A., and Korsmeyer, S. J.** (2004). Survival factor-induced extracellular signal-regulated kinase phosphorylates BIM, inhibiting its association with BAX and proapoptotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15313-15317.
- Hardwick, J. M.** (2001). Apoptosis in viral pathogenesis. *Cell Death Differ* 8, 109-110.
- Harmala-Brasken, A. S., Mikhailov, A., Soderstrom, T. S., Meinander, A., Holmstrom, T. H., Damuni, Z., and Eriksson, J. E.** (2003). Type-2A protein phosphatase activity is required to maintain death receptor responsiveness. *Oncogene* 22, 7677-7686.
- Hatai, T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H., and Takeda, K.** (2000). Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem* 275, 26576-26581.
- Ho, P. K., and Hawkins, C. J.** (2005). Mammalian initiator apoptotic caspases. *Febs J* 272, 5436-5453.
- Holcik, M., Gibson, H., and Korneluk, R. G.** (2001). XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 6, 253-261.
- Holmstrom, T. H., Tran, S. E., Johnson, V. L., Ahn, N. G., Chow, S. C., and Eriksson, J. E.** (1999). Inhibition of mitogen-activated kinase signaling sensitizes HeLa cells to Fas receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 19, 5991-6002.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J.** (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-495.
- Hsu, S. C., Gavrilin, M. A., Tsai, M. H., Han, J., and Lai, M. Z.** (1999). p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression. *J Biol Chem* 274, 25769-25776.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.*** (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-195.
- Ivanov, V. N., Krasilnikov, M., and Ronai, Z.** (2002). Regulation of Fas expression by STAT3 and c-Jun is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase-AKT signaling. *J Biol Chem* 277, 4932-4944.
- Johnson, G. L., and Lapadat, R.** (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Jones, R. G., Elford, A. R., Parsons, M. J., Wu, L., Krawczyk, C. M., Yeh, W. C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J. R., and Ohashi, P. S.** (2002). CD28-dependent

activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *J Exp Med* 196, 335-348.

Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacsovics, M., and Tschopp, J. (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* 10, 640-648.

Kermer, P., Liman, J., Weishaupt, J. H., and Bahr, M. (2004). Neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases: from basic research to clinical application. *Neurodegener Dis* 1, 9-19.

Kerr, J. F., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kirchhoff, S., Muller, W. W., Krueger, A., Schmitz, I., and Krammer, P. H. (2000). TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* 165, 6293-6300.

Kondo, G., Iwase, M., Watanabe, H., Uchida, M., Takaoka, S., Ohashi, M., Ito, D., and Nagumo, M. (2005). Enhancement of susceptibility to Fas-mediated apoptosis in HL-60 cells through down-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Oncol Rep* 14, 1215-1222.

Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.

Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. (2001). NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.

Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001a). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21, 8247-8254.

Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001b). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 276, 20633-20640.

Lavrik, I. N., Golks, A., and Krammer, P. H. (2005). Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115, 2665-2672.

Lee, M. W., Bach, J. H., Lee, H. J., Lee, D. Y., Joo, W. S., Kim, Y. S., Park, S. C., Kim, K. Y., Lee, W. B., and Kim, S. S. (2005). The activation of ERK1/2 via a tyrosine kinase pathway attenuates trail-induced apoptosis in HeLa cells. *Cancer Invest* 23, 586-592.

- Mahoney, J. A., and Rosen, A.** (2005). Apoptosis and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 17, 583-588.
- Majewski, N., Nogueira, V., Robey, R. B., and Hay, N.** (2004). Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Mol Cell Biol* 24, 730-740.
- Martinon, F., and Tschopp, J.** (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* 117, 561-574.
- Mezosi, E., Wang, S. H., Utsugi, S., Bajnok, L., Bretz, J. D., Gauger, P. G., Thompson, N. W., and Baker, J. R., Jr.** (2005). Induction and regulation of Fas-mediated apoptosis in human thyroid epithelial cells. *Mol Endocrinol* 19, 804-811.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J.** (2001). NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21, 5299-5305.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G.** (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Milburn, C. C., Deak, M., Kelly, S. M., Price, N. C., Alessi, D. R., and Van Aalten, D. M.** (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J* 375, 531-538.
- Moriyama, H., and Yonehara, S.** (2007). Rapid up-regulation of c-FLIP expression by BCR signaling through the PI3K/Akt pathway inhibits simultaneously induced Fas-mediated apoptosis in murine B lymphocytes. *Immunol Lett* 109, 36-46.
- Nagata, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., and Fukuyama, H.** (2003). Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108-116.
- Nam, S. Y., Jung, G. A., Hur, G. C., Chung, H. Y., Kim, W. H., Seol, D. W., and Lee, B. L.** (2003). Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mechanism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci* 94, 1066-1073.
- Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., and Lin, A.** (1998). Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 273, 16415-16420.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P.** (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., and Donner, D. B.** (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401, 82-85.
- Panka, D. J., Mano, T., Suhara, T., Walsh, K., and Mier, J. W.** (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem* 276, 6893-6896.

- Plate, J. M.** (2004). PI3-kinase regulates survival of chronic lymphocytic leukemia B-cells by preventing caspase 8 activation. *Leuk Lymphoma* 45, 1519-1529.
- Porras, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A. M., Ambrosino, C., Benito, M., and Nebreda, A. R.** (2004). P38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 15, 922-933.
- Poukkula, M., Kaunisto, A., Hietakangas, V., Denessiouk, K., Katajamaki, T., Johnson, M. S., Sistonen, L., and Eriksson, J. E.** (2005). Rapid turnover of c-FLIPshort is determined by its unique C-terminal tail. *J Biol Chem* 280, 27345-27355.
- Pugazhenth, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K. A., Boxer, L. M., Heasley, L. E., and Reusch, J. E.** (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 275, 10761-10766.
- Riedl, S. J., and Salvesen, G. S.** (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 405-413.
- Riedl, S. J., and Shi, Y.** (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E.** (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Schneider, P., Holler, N., Bodmer, J. L., Hahne, M., Frei, K., Fontana, A., and Tschopp, J.** (1998). Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 187, 1205-1213.
- Shi, Y.** (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470.
- Shibue, T., and Taniguchi, T.** (2006). BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* 119, 2036-2043.
- Solovyan, V. T., Bezvenyuk, Z. A., Salminen, A., Austin, C. A., and Courtney, M. J.** (2002). The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis. *J Biol Chem* 277, 21458-21467.
- Song, G., Ouyang, G., and Bao, S.** (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9, 59-71.
- Starck, L., Scholz, C., Dorken, B., and Daniel, P. T.** (2005). Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *Eur J Immunol* 35, 1257-1266.

Suhara, T., Mano, T., Oliveira, B. E., and Walsh, K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling controls endothelial cell sensitivity to Fas-mediated apoptosis via regulation of FLICE-inhibitory protein (FLIP). *Circ Res* 89, 13-19.

Suzuki, A., Hayashida, M., Kawano, H., Sugimoto, K., Nakano, T., and Shiraki, K. (2000). Hepatocyte growth factor promotes cell survival from fas-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells via Akt activation and Fas-death-inducing signaling complex suppression. *Hepatology* 32, 796-802.

Tafani, M., Karpinich, N. O., Serroni, A., Russo, M. A., and Farber, J. L. (2006). Re-evaluation of the distinction between type I and type II cells: the necessary role of the mitochondria in both the extrinsic and intrinsic signaling pathways upon Fas receptor activation. *J Cell Physiol* 208, 556-565.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.

Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., and Ichijo, H. (2001). ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2, 222-228.

Tourian, L., Jr., Zhao, H., and Srikant, C. B. (2004). p38alpha, but not p38beta, inhibits the phosphorylation and presence of c-FLIPS in DISC to potentiate Fas-mediated caspase-8 activation and type I apoptotic signaling. *J Cell Sci* 117, 6459-6471.

Tran, S. E., Holmstrom, T. H., Ahonen, M., Kahari, V. M., and Eriksson, J. E. (2001). MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors. *J Biol Chem* 276, 16484-16490.

Trapani, J. A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* 2, REVIEWS3014.

Tschopp, J., Martinon, F., and Burns, K. (2003). NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 95-104.

Uriarte, S. M., Joshi-Barve, S., Song, Z., Sahoo, R., Gobejishvili, L., Jala, V. R., Haribabu, B., McClain, C., and Barve, S. (2005). Akt inhibition upregulates FasL, downregulates c-FLIPs and induces caspase-8-dependent cell death in Jurkat T lymphocytes. *Cell Death Differ* 12, 233-242.

Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.

Viswanath, V., Wu, Y., Boonplueang, R., Chen, S., Stevenson, F. F., Yantiri, F., Yang, L., Beal, M. F., and Andersen, J. K. (2001). Caspase-9 activation results in downstream caspase-8 activation and bid cleavage in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease. *J Neurosci* 21, 9519-9528.

- Vogler, M., Durr, K., Jovanovic, M., Debatin, K. M., and Fulda, S.** (2007). Regulation of TRAIL-induced apoptosis by XIAP in pancreatic carcinoma cells. *Oncogene* 26, 248-257.
- Wang, P., Zhang, J., Bellail, A., Jiang, W., Hugh, J., Kneteman, N. M., and Hao, C.** (2007). Inhibition of RIP and c-FLIP enhances TRAIL-induced apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cell Signal* 19, 2237-2246.
- Wang, W., Prince, C. Z., Mou, Y., and Pollman, M. J.** (2002). Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 21723-21729.
- Wang, Z. B., Liu, Y. Q., and Cui, Y. F.** (2005). Pathways to caspase activation. *Cell Biol Int* 29, 489-496.
- Weston, C. R., and Davis, R. J.** (2007). The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 19, 142-149.
- Wilson, T. R., McLaughlin, K. M., McEwan, M., Sakai, H., Rogers, K. M., Redmond, K. M., Johnston, P. G., and Longley, D. B.** (2007). c-FLIP: a key regulator of colorectal cancer cell death. *Cancer Res* 67, 5754-5762.
- Xing, H., Zhang, S., Weinheimer, C., Kovacs, A., and Muslin, A. J.** (2000). 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *Embo J* 19, 349-358.
- Yang, S., Thor, A. D., Edgerton, S., and Yang, X.** (2006). Caspase-3 mediated feedback activation of apical caspases in doxorubicin and TNF-alpha induced apoptosis. *Apoptosis* 11, 1987-1997.
- Yeh, J. H., Hsu, S. C., Han, S. H., and Lai, M. Z.** (1998). Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J Exp Med* 188, 1795-1802.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R.** (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-652.
- Zhang, J., Gao, J. X., Salojin, K., Shao, Q., Grattan, M., Meagher, C., Laird, D. W., and Delovitch, T. L.** (2000). Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Exp Med* 191, 1017-1030.

ANEXO

Mechanisms involved in the regulation of c-FLIP_L and c-FLIP_S by serum starvation in tumour cells. Implication in Fas-induced apoptosis.

Pilar López, Ana Chocarro, Marta Peláez, Susana Alemany, and Margarita Fernandez-Renart

**Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM Arturo Duperier, 4,
28029 Madrid Spain**

**Address correspondence to: Susana Alemany Instituto de Investigaciones Biomédicas
“Alberto Sols” CSIC-UAM Arturo Duperier 4, 28029 Madrid Spain**

Phone: 34-91-4975418; Fax: 34-91-5854401; E mail: salemany@iib.uam.es

ABSTRACT

Stimulation of Fas/CD95 triggers caspase-8 activation that leads lastly to executory caspases activation and apoptosis. Many cancer cell lines remain resistant to Fas-mediated apoptosis. To develop drugs useful for cancer therapy it is important to know the mechanisms involved in the resistance of tumor cells to apoptosis. Here, we show the molecular mechanisms involved in the resistance of the cervical cancer line HeLa and the human cancer pancreatic cell line BxPC3 to apoptosis and its sensitization to Fas-induced apoptosis by serum withdrawal. In the case of HeLa cells, serum deprivation causes a down regulation in c-FLIP_S levels, the major brake for caspase-8 activation in these cells. This down regulation is likely mediated by the fall in Akt activity, also observed by serum withdrawal. In these cells the sole and complete inhibition of Akt also induces an activation of both caspase-8 and caspase-9, being active caspase-9 also observed in the absence of active caspase-8. In the case of BxPC3 cells the specific blockage of Akt activity mainly sensitizes to Fas-induced apoptosis. These cells show very low c-FLIP_S levels and c-FLIP_L is the major brake for caspase-8 activation, down regulation of c-FLIP_L as well as apoptosis can be achieved by the cooperation of Fas engagement together with serum starvation or with cycloheximide treatment. All these data demonstrate that serum starvation, by modulating different events, in different cell types, is a good tool to sensitize tumor apoptosis-resistant cells to apoptosis.

Keywords: Apoptosis, Fas/CD95, PI3 kinase/Akt, c-FLIP, tumor cells

INTRODUCTION

Fas (CD95/APO-1) is a transmembrane protein belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. Fas was identified as a cell death inducer of malignant human cancer and leukaemia cell lines [1, 2]. Stimulation of Fas with its cognate ligand or agonistic antibodies results in receptor oligomerization and recruitment of signalling proteins in a death-inducing signalling complex (DISC) [3-5]. The formation of DISC involves recruitment of the adaptor protein FADD, procaspase-8 and the regulator c-FLIP. FADD binds to Fas via homotypic death domain (DD) interactions, and to procaspase-8 via a homotypic death effector domain (DED) interaction. The Fas/FADD/procaspase-8 initiated pathway appears to be the main mediator of Fas-induced apoptosis [6, 7]. Stimulation of Fas allows procaspase-8 dimerization and its activation by autocatalytic cleavage [8]; in this process two cleavage steps are involved, the initial cleavage generates caspase-8 p43/41 and p12; subsequently p12 is rapidly converted to p10. Afterwards an additional cleavage of p43/41 occurs producing the enzyme active caspase-8 p18 and the inactive p26/24 prodomain. Activated caspase-8 induces apoptosis either by initiating directly a cascade of cleavages of effector caspases and eventually of poly (ADP)-ribose polymerase (PARP) [9] in Type I cells or initiates a mitochondrial amplification loop in Type II cells [10]. Recently, Samraj et al [11] by using a caspase-9 deficient Jurkat cells, have proposed that in Type II cells caspase-9 activation is required for the amplification of the caspase-8 activation and for the loss of mitochondrial membrane potential in Fas and TRAIL induced apoptosis.

c-FLIP is expressed as a long (c-FLIP_L) and a short (c-FLIP_S) splice form. The c-FLIP_L protein is homologous to procaspase-8, consisting of two tandemly repeated DEDs and a catalytically inactive caspase-like domain. c-FLIP_S shares most of its sequence with c-FLIP_L and has only the two DEDs followed by a C-terminal tail, required for regulation of the turnover of the protein. Both c-FLIP proteins act as inhibitors of caspase-8 mediated apoptosis through binding to DED in FADD [12, 13]. Using cells overexpressing c-FLIP

proteins, it has been proposed that c-FLIP_S prevents the initial cleavage step of procaspase-8, whereas c-FLIP_L allows the initial cleavage step to caspase-8 p43/41, but blocks further processing and consequently the generation of caspase p18 [14]. Other roles have also been ascribed to c-FLIP_L. It has been proposed that, under certain conditions, c-FLIP_L can act as a pro-apoptotic molecule, facilitating the activation of procaspase-8 [15, 16]. Besides, c-FLIP_L whose synthesis is induced by NFκB, can induce activation of the NFκB signalling pathway [17].

In general the PI3K pathway can control cell death through the phosphorylation of Akt in a large number of cell types. Activated Akt has been demonstrated to protect cells by various mechanisms, from the apoptosis induced by a variety of stimuli. Akt has been involved in the suppression of apoptosis through inactivation of several components of the cell-death machinery, including Bad [18, 19], caspase-9 [20], the Forkhead family of transcription factors [21], the IκB-kinase, or CREB [reviewed in [22]]. PI3K/Akt can also control death receptor-mediated apoptosis in various cell types by means of regulating the expression level of c-FLIP proteins [23-25].

Here we compare in three different tumor cells (HeLa, BxPC3, and AsPC1) resistant to Fas-induced apoptosis in the presence of serum, the effect of serum deprivation on its sensitization to Fas-induced apoptosis. We demonstrate that the decrease in pAkt levels observed by serum starvation plays different roles in the sensitivity to apoptosis in the studied cell lines. Furthermore, we have also studied the function of c-FLIP_L and c-FLIP_S in preventing apoptosis in these cells and their modulation by serum starvation. In conclusion, we demonstrate that serum starvation, by modulating different events in different cell types, is an excellent tool to sensitize some tumor apoptosis-resistant cells to Fas-induced apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies, plasmids, and reagents. The anti-Fas multimeric mouse anti-human monoclonal (IgM isotype, CH-11, inducer of apoptosis) was purchased from MBL. The anti-Fas mouse anti-human monoclonal (IgG isotype, does not induce apoptosis), the anti-FADD, anti-XIAP, anti-c-IAP-1, and anti-c-IAP-2 antibodies were obtained from Biosciences Pharmingen. The anti-pERK 1/2, anti-ERK 2, anti-Akt, anti-Bcl_{XL}, and anti-c-Myc were obtained from Santa Cruz. The anti-cleaved caspase-9, anti-cleaved caspase-8, anti-pAkt (Ser 473), anti-pp38, anti-pRaf, anti-pJNK, and anti-pGSK3 were from Cell Signalling. The anti-FLIP antibody was from Alexis Biochemicals, anti-PARP antibody from R&D, and the anti-RIP antibody from Abcam. The human recombinant Fas ligand, the anti-Fas monoclonal antibody, the anti-tubulin antibody, cycloheximide (CHX), and FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody were obtained from Sigma-Aldrich. LY294002 (LY, PI3K inhibitor) and U0126 (UO, MEK inhibitor) were obtained from Tocris; and the caspase-8 inhibitor II, Z-IETD-FMK (z-IETD), from MERCK. The constructs used were: PBB14, encoding the Us9-EGFP fusion protein under the control of the CMV immediate early promoter, was kindly provided by Dr Banfield. The pCDNA3 was from Invitrogen, the pSFFV-Bcl-2 plasmid was kindly provided by Dr L. del Peso, and the Myr-Akt-HA plasmid by Dr. J. Renart.

Cell culture, stimulation, and transfection. HeLa cells were cultured in DMEM-HEPES medium supplemented with 5% heated inactivated FBS (GIBCO, BRL), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml gentamicin (GIBCO, BRL). Jurkat, BxPC3, and AsPC1 were cultured in RPMI medium supplemented with 10% heated inactivated FBS, 1 mM Sodium Pyruvate, 2 mM glutamine, and 100 µg/ml gentamicin. Cells cultures were maintained in an atmosphere of 95% air, 5% CO₂. For cell stimulation, cells were plated at a

density of 5×10^5 cells/60 mm and 24 h later, cells were either stimulated for the indicated times (+S), or serum starved for a further period of 20-24 h and then stimulated (24 h-S). Transfection assays were carried out by the standard calcium phosphate procedure. Ten micrograms of pCDNA3, SFFV-Bcl-2, or Myr-Akt-HA were co-transfected with 2-4 μ g of PBB14 (GFP) in 100 mm plates. Forty eight hours after transfection, cells were washed and incubated in the same medium without serum. Few minutes after serum starvation different stimuli, as indicated in the Figure Legends, were added for 15 h.

Western blot analysis. Western blots were performed as described previously [26]. PVDF membranes (Pall Corporation) were probed with the antibodies indicated in the Figure Legend. The blots were developed using the ECL chemoluminescent method (Amersham Bioscience).

Flow Cytometry analysis. Surface expression analysis of Fas receptor was carried out by incubating cells (1×10^6) in 100 μ l of PBS-5% BSA plus 1 μ g Fas antibody (IgG) for 60 min at 4°C. Cells were then washed twice in cold-PBS and treated with FITC-conjugated secondary antibody for 45 min at 4°C. After incubation cells were washed twice in cold-PBS and resuspended in 300 μ l of PBS and analyzed on a BD Bioscience FACScan. Non specific fluorescence was assessed using normal isotype-matched mouse IgG followed by secondary antibody. To perform the cell cycle analysis, cells were harvested in PBS and fixed in 70% cold ethanol at 4°C. After fixation cells were washed in cold-PBS to remove ethanol, resuspended in 0.5 ml of PBS plus 0.5 ml of a buffer containing 0.2 M Na_2HPO_4 and 4 mM citric acid pH 7.8, and incubated for 10 min at 37°C. Cells were centrifuged and resuspended in PBS with 100 μ g/ml RNase A for 20 min, and subsequently propidium iodide to a final concentration of 30 μ g/ml was added.

RESULTS

HeLa cells are sensitized to Fas-induced apoptosis by serum starvation. Engagement of Fas receptors with agonistic IgM (CH11) or IgG anti-Fas antibodies does not promote apoptosis in HeLa cells when the treatment is performed in the presence of 5% serum, whereas the Jurkat T cell line in the presence of 10% serum are driven to apoptosis when exposed to CH11 (Fig. 1A, 1B). However, 24 h of serum starvation, sensitize HeLa cells to CH11, Fas-mediated apoptosis (Fig. 1C). A similar serum withdrawal sensitization to Fas-induced apoptosis was observed when HeLa cells were stimulated with Fas-Ligand plus anti-Fas monoclonal antibody and as expected stimulation of 24 h serum starved HeLa cells with IgG anti-Fas antibody did not induce apoptosis (data not shown), providing evidence of the specificity of the apoptotic signal generated by CH11 stimulation. The sensitization to Fas-mediated apoptosis by serum starvation is not due to a change in the number of Fas receptors in the plasma membrane, since these cells contain a large and similar number of these receptors independently of the presence or absence of serum (Fig. 1D). The sensitivity of serum starved cells to CH11 is stimulus concentration dependent (Fig. 1E).

Scaffidi et al [10] have demonstrated that Fas stimulation can trigger apoptosis through two different pathways, Type I (SKW6.4 or H9 cells) or Type II (Jurkat cells). Only Type II cells are dependent on mitochondria to amplify caspase-8 activation during death receptor-induced apoptosis. In order to investigate if the Fas-promoted apoptosis in serum-deprived HeLa cells is mitochondria dependent, we have ectopically expressed Bcl-2 together with GFP (3:1 ratio) and analyzed the Fas-mediated apoptosis in the GFP-positive transfected cells. Fas-mediated apoptosis is clearly diminished in Bcl-2 transfected cells (Fig. 1F), indicating that HeLa serum starved cells behaved as Type II cells.

Serum starvation leads to lower pAkt, pERK 1/2, and c-FLIP_S levels. In order to investigate the status of different proteins known to be involved in apoptosis control, we performed a time course of serum deprivation in HeLa cells and analyze by Western blot a large set of proteins that might control apoptosis at different levels. Among the proteins checked are the Fas-associated death domain protein (FADD) and the caspase-8 inhibitor proteins c-FLIP_L and c-FLIP_S, that together with the activated death receptor and procaspase-8 form the core of the death-inducing signalling complex (DISC); the IAP family of proteins, that function through direct or indirect interactions to inhibit the activity of several caspases, including caspase-3, caspase-7, and caspase-9 [27, 28]; the Bcl-2 family proteins Bcl_x_L (anti-apoptotic) and Bad (pro-apoptotic) [29]. Lastly, we also checked the phosphorylation state of several protein kinases that have been involved in survival or apoptosis induction as Akt, ERK 1/2, Raf, JNK, or p38. Among all the proteins studied, serum deprivation only induces a significant decrease in the levels of c-FLIP_S as well as a decrease in the phosphorylation state of the protein kinases ERK 1/2 and Akt (Fig. 2). In correlation with the decreased pAkt levels upon serum starvation, a fall in the phosphorylation state of GSK3 is also observed.

To investigate if the decrease in the phosphorylation state of ERK 1/2 or Akt plays a role in the sensitization of HeLa cells, we have analyzed the effect of U0126 (U0, MEK inhibitor) and LY294002 (LY, PI3K inhibitor), on the promotion of apoptosis. We have detected only a very slight effect of U0 inhibitor at 10 μ M, that blocks pERK 1/2 phosphorylation (data not shown), on Fas-mediated apoptosis, with independence of the presence or absence of serum in the medium (Fig. 3A). In contrast, LY used at 20 μ M, that drastically blocks the Akt pathway (Fig. 3B), promotes apoptosis, either in the absence or in presence of 5% of serum in the medium (Fig. 3A). The apoptotic role of LY is reverted when

HeLa cells are transfected with Akt-Myr, an active version of Akt (Fig. 3C), pointing out that the target involved in the prevention of apoptosis inhibited by LY stimulation is Akt.

To investigate if the protective effect of serum might be due, at least in part, to the ability of serum to keep the Akt pathway active, we treated cells growing in the presence of 5% serum with low concentrations of LY together with or without CH11. Low concentrations of this drug, that partially reduces the phosphorylation state of Akt, sensitizes the cells to Fas-mediated apoptosis, and a synergistic effect in the induction of apoptosis is observed (Fig. 3B). In fact, the transfection of Akt-Myr that increases Akt activity reduces in a 30% the Fas-induced apoptosis in serum-deprived cells (Fig. 3C). Furthermore, there is a correlation between a transient decrease in pAkt levels after Fas stimulation and the promotion of apoptosis. Only CH11 (anti-Fas IgM antibody) but not the anti-Fas IgG antibody (data not shown) promotes in serum starved, but not in serum growing cells, a fast and transient decrease in pAkt (Fig. 3D). Besides preincubation with IGF-1, an Akt pathway activator (Fig. 3E), prior to CH11 stimulation prevents the inhibition of the pAkt levels (Fig. 3F) and decreases the promotion of apoptosis (Fig. 3G) induced by CH11. On the other hand, both anti-Fas IgG antibody (data not shown) and CH11 (IgM) activate ERK 1/2 independently of the absence or presence of 5% serum in the cells medium (Fig. 3D). All these data are in favour of Akt, but not ERK 1/2 activity, playing a protective role in Fas-mediated apoptosis in HeLa cells.

Role of caspase-8 in Fas- and LY-induced apoptosis in HeLa cells. In order to study the mechanisms involved in the LY- and Fas-promoted apoptosis in HeLa cells, we have analyzed c-FLIP_L and c-FLIP_S levels, the cleavage of caspase-8, caspase-9, and PARP in cells stimulated with both signals for different periods of time. LY or CH11 stimulation, either in the absence or presence of 5% serum, induces a small decrease in c-FLIP_L levels;

whereas LY, but not CH11, treatment promotes a clear decrease in the level of c-FLIP_S with independence of the presence or absence of serum (Fig. 4A). The addition of CH11 and LY together, also independently of the presence or absence of 5% serum, down regulates more efficiently both forms of c-FLIP and correlates with an increase in the PARP cleavage (Fig. 4A). All these data indicate that in HeLa cells a small reduction in c-FLIP_L levels is not sufficient to induce apoptosis by Fas stimulation but decreased c-FLIP_S levels, below a threshold, obtained by serum starvation or by LY incubation, is concomitant with the induction of apoptosis.

The two cleavage events described to be required for caspase-8 activation are observed when HeLa cells are treated with CH11, the p43/41 fragments product of the first cleavage and p18 fragment product of the second cleavage (Fig. 4B). The caspase-8 p43/41 fragments as well as the caspase-8 p18 fragment are apparent 1 h after the stimulus, correlating the generation of these fragments with the appearance of c-FLIP_L p43 (Fig. 4A). However LY treatment shows a different pattern of caspases activation. Akt inhibition allows a more efficient procaspase-8 first cleavage than CH11, but a more inefficient caspase-8 second cleavage, LY treatment also generates less c-FLIP_L p43 fragment than CH11. Besides the delayed caspase-8 activation, a clear activation of caspase-9 is observed 1 h after the stimulus.

In order to investigate the relevance of caspase-8 activity in the apoptosis promoted by these two stimuli, we have analyzed the effect of caspase-8 inhibition by the addition of z-IETD in the apoptosis promoted by CH11 or LY. As expected, caspase-8 inhibition prevents the accumulation of the caspase-8 fragments p43/41 as well as p18, and c-FLIP_L fragment p43, in cells either stimulated with LY or CH11 (Fig. 4D). Inhibition of caspase-8 activity in CH11 stimulated HeLa cells blocks activation of caspase-9 (Fig. 4D), indicating that caspase-8 activity is upstream of caspase-9. In agreement, the apoptosis promoted by

CH11 is completely prevented by caspase-8 inhibition (Fig. 4C). However, inhibition of caspase-8 activity does not affect the activation of caspase-9 induced by LY (Fig. 4D), indicating that in this case the generation of active caspase-9 is mainly caspase-8 independent. In fact, and in contrast with the data obtained with CH11 stimulation, the inhibition of caspase-8 activity blocks only partially the apoptosis induced by LY in HeLa cells (Fig. 4C).

Serum starvation and LY sensitizes BxPC3, but not AsPC1 cells to Fas-induced apoptosis. To determine if sensitization to Fas-induced apoptosis by serum starvation is a particular feature of HeLa cells or not, we analyzed the behaviour of two human cancer pancreatic cell lines as AsPC1 and BxPC3, (also resistant to Fas-induced apoptosis in the presence of 10% serum), to Fas stimulation in 24 h serum depleted cells. BxPC3 are also sensitized to Fas-induced apoptosis by serum starvation (Fig. 5A). In these cells, like in HeLa, the blockage of ERK 1/2 phosphorylation does not sensitize them to apoptosis. Nevertheless and in sharp contrast to HeLa cells, BxPC3 in the presence of 10% serum in the media are resistant to LY-promoted apoptosis, at concentrations of LY that completely blocks the Akt pathway (data not shown). In 24 h serum-deprived cells LY is only a weak apoptotic signal (Fig. 5A). Nevertheless, in these cells the inhibition of the Akt pathway strongly sensitizes to Fas-induced apoptosis. We also decided to analyze the status of the proteins c-FLIP and pAkt after serum starvation. The levels of c-FLIP_S are extremely low in BxPC3 cells, compared to HeLa cells and could be hardly detected, besides no significant differences in the levels of c-FLIP_L were observed by serum withdrawal (Fig. 5B). In these cells, as in HeLa, a decrease of pAkt levels is also observed by serum starvation.

In serum starved BxPC3 cells, Fas engagement, but not LY, (in agreement with the poor apoptotic capacity of LY in these cells) promotes a decrease in the levels of c-FLIP_L

together with generation of the p43 fragment, as well as caspase-8 and caspase-9 activation (Fig. 5C). Nevertheless, when the cells are treated with both drugs together, the c-FLIP_L levels are more efficiently down regulated (Fig. 5C) and a synergistic effect in terms of caspase-8 and caspase-9 activation, PARP cleavage, and percentage of the Sub G1 population is observed (Fig. 5C, 5A). In these cells caspase-8 inhibition also prevents caspase-9 activation and apoptosis mediated by CH11 stimulation (Fig. 5D, 5E).

In contrast to HeLa and BxPC3 cells, in AsPC1 cells treatment with CH11 or LY (at doses that produces a blockage of Akt phosphorylation) or both signals together, is not sufficient to induce apoptosis in 24 h serum-deprived cells (Fig. 5F). These cells show very high levels of c-FLIP_L and c-FLIP_S and only the incubation with both CH11 and LY together induces a significant decrease in the levels of both c-FLIP proteins, but this partial down regulation is not sufficient to generate p18 caspase-8 (Fig. 5G) or to detect the active form of caspase-9 p35 (data not shown).

c-FLIP_S in HeLa and AsPC1 cells, and c-FLIP_L in BxPC3 cells are the major brakes to induce caspase-8 activation by Fas stimulation. It is well established that cycloheximide (CHX), a protein synthesis inhibitor, sensitizes cells to apoptosis mediated by death receptors, due to its ability to block the synthesis of the c-FLIP proteins [30]. Since HeLa, BxPC3, and AsPC1 cells show different levels of c-FLIP_S and c-FLIP_L and a different relative expression levels between both proteins (data not shown), we decided to analyze the sensitization to Fas-induced apoptosis in the presence of CHX. In 5% serum growing HeLa cells CHX, induces the disappearance of c-FLIP_S and a clear decrease in the levels of c-FLIP_L (Fig. 6B). CHX sensitizes to CH11-induced apoptosis, and to a less degree the LY-induced apoptosis (Fig. 6A). The addition of CH11 together with CHX increases in a dramatic fashion the activation of caspase-8 and caspase-9 correlating with the

disappearance of both forms of c-FLIP. LY addition together with CHX only induces a slight increase in the generation of caspase-8 p18 (Fig. 6B). Since CHX blocks the synthesis of both forms of c-FLIP proteins, the further decrease in the c-FLIP_L levels induced by CH11 stimulation is probably due to an increase in the degradation rate of c-FLIP_L.

In 10% serum growing BxPC3 cells CH11 stimulation is not able to decrease c-FLIP_L levels (Fig. 6D), but the addition of CHX together with CH11 induce a decrease in the level of c-FLIP_L, correlating with a clear promotion of caspase-8 and caspase-9 activation (Fig. 6D) and ultimately with apoptosis (Fig. 6C). All these data suggest that in these cells the caspase-8 activation is mainly controlled by the c-FLIP_L level. When CHX is added together with LY we can detect an increase in apoptosis that correlates with increase in caspase-9 activity, but in contrast with the data obtained with HeLa cells, this caspase-9 activation is independent of a modulation of c-FLIP_L levels and caspase-8 activation (Fig. 6D).

The exposure of 10% serum growing AsPC1 cells to CHX induces a complete down regulation of the c-FLIP_S levels, without significant changes in c-FLIP_L (Fig. 6F). This decrease in c-FLIP_S levels induced by CHX, very likely allows activation of caspase-8 and caspase-9 when added together with CH11, but not when added together with LY (Fig. 6F), indicating that CH11 produce some intracellular signal, required to induce caspase-8 activation, that is not provided by the incubation with LY. Nevertheless, in these cells the generation of active caspase-8 by CH11 and CHX is still no sufficient to induce apoptosis (Fig. 6E).

DISCUSSION

Understanding the basis of the resistance of tumor cells to death receptors-mediated apoptosis and to develop tools to sensitize them is an important step in order to design new strategies to kill tumor cells. We show here that two tumor cells HeLa and BxPC3 cells become responsive to Fas-induced apoptosis by serum starvation. Serum starvation promotes in different cell types a decrease in the phosphorylation state of Akt and ERK 1/2 and can also modulate c-FLIP levels.

It has been proposed that a decrease in the levels of pERK 1/2 sensitizes to Fas-mediated apoptosis in some tumor cells. Using thyroid cells lines, it has been shown that Fas-induced apoptosis is increased when the cells were exposed to specific MEK inhibitors [31]. Besides, death receptors-mediated apoptosis has been shown to be inhibited in U937 cells, by treatment with phosphatase inhibitors, that increase the pERK 1/2 levels and apoptosis is protected by stable transfection with active MEK1 [32]. Panka et al [24] have studied the role of ERK 1/2 in the expression of c-FLIP protein in colon cancer cell lines, and have shown that the MEK1 inhibitor PD98059 reduced c-FLIP levels in the colon cancer cell lines HT29 and DLD-1. Moreover, it has been also reported that in Hela cells the inhibition of ERK 1/2 phosphorylation sensitizes to apoptosis when a Fas close related receptor, like TRAIL, is stimulated [33]. Although our data clearly indicate that decreased pERK 1/2 levels do not have a relevant role in Fas-induced apoptosis in HeLa, BxPC3, or AsPC1 cells, since this is not the case for other cells lines, it is likely that serum deprivation, by decreasing p-ERK 1/2 levels, could be also a useful tool to sensitize some tumor cells to death receptor-mediated apoptosis.

Our data demonstrate that the decrease in the pAKT levels by serum starvation plays different roles in the induction of apoptosis in the different cell lines studied. In fact, the

capacity of pAkt inhibition to promote apoptosis in HeLa, BxPC3, or AsPC1 cells is completely different. In AsPC1 cells LY does neither induce nor sensitizes to Fas-induced apoptosis or caspase-8 activation, in BxPC3 cells LY mainly sensitizes to CH11-mediated apoptosis, and in HeLa cells Akt inhibition is sufficient to induce apoptosis through the generation of active caspase-9 and of active caspase-8.

It is established that activated AKT protects from apoptosis by regulating different events in many different cell types. The role of Akt in the sensitization of death receptors-mediated apoptosis by decreasing the expression levels of c-FLIP_L and/or c-FLIP_S and consequently promotion of caspase-8 activation has been documented [23-25, 34]. In, human gastric cancer cells, B cells, T cells or HL-60 cells [23, 35-37] the PI3K/Akt pathway mainly controls c-FLIP_S expression, whereas in endothelial or Glioblastoma cells lines controls c-FLIP_L [34, 38]. In BxPC3 cells c-FLIP_S levels can be hardly detected; thereby it is unlikely that c-FLIP_S would be involved in the prevention of induced apoptosis in these cells, being this role achieved by c-FLIP_L. The presence of 10% serum blocks the capacity of Fas stimulation to decrease c-FLIP_L levels and CHX or serum starvation is required to induce a partial c-FLIP_L down regulation, caspase-8 activation and apoptosis. In HeLa cells c-FLIP_S is the major brake to prevent Fas-mediated apoptosis and the presence of 5% serum, likely mediated by Akt activity, blocks its down regulation.

It is well sustained a role of the Akt pathway in apoptosis prevention, not only by regulating c-FLIP proteins level, but also through the inactivation of pro-apoptotic proteins and inactivation of anti-apoptotic proteins that leads to the generation of active caspases. Several mechanisms have been reported to be involved in the prosurvival effect of Akt like Bad phosphorylation [18, 19] and sequestration of phosphorylated Bad in the cytosol [39], phosphorylation and inactivation of Forkhead transcription factors involved in death genes

expression [21], or phosphorylation and blockage of the cleavage of pro-caspase-9 [20]. In HeLa cells the LY promoted apoptosis is drastically reduced by ectopic expression of Bcl-2 (not shown) indicating that mitochondrial events are involved, thereby it is likely that the generation of caspase-9 activity by LY in HeLa cells, which is caspase-8 independent, is through the inhibition of some of these mechanisms.

It had been proposed some other mechanisms by which Akt might provide apoptosis protection. In hepatocellular carcinoma cells, it has been shown that HGF, that also increase Akt activity, interrupted Fas-DISC formation, because procaspase-8 interaction in the DISC was decreased [40]. In T cells, the expression of active Akt provide resistance to Fas-induced apoptosis due to impaired recruitment of procaspase-8 to the DISC, without changes in the levels of c-FLIP proteins [41]. We have observed a fast and transient decrease in Akt activity when CH11 stimulation promotes apoptosis in HeLa cells. These results could suggest that in these cells, Akt activity might be also interfering with an early event triggered by Fas engagement, supporting another different role of Akt in the generation of caspase-8 activation independent of the modulation of c-FLIP levels. In fact, LY by itself promotes apoptosis that is, at least partially, caspase-8 activity dependent, but since the down regulation of c-FLIP proteins by CHX, is not sufficient to induce apoptosis, it is likely that Akt inhibition, induce active caspase-8 not only by reducing the levels of the c-FLIP proteins, but another mechanism has to be involved in the process. Nevertheless, the possibility that caspase-9 activity would be involved in this process remains to be elucidated. On the other hand, it have been reported, using chronic lymphocytic leukemia cells, that the capacity of LY to promote apoptosis is caspase-8 dependent but Akt independent [42]. However, the fact that Akt-Myr overexpression completely prevents the LY induced-apoptosis in HeLa cells excludes this possibility. This central role of Akt in controlling

apoptosis by different pathways in HeLa cells has not been observed in the other two lines tested.

In AsPC1 cells the involvement of the protein XIAP in their resistance to apoptosis has been recently reported [43]; however, our data indicate that some other mechanism must be involved, since Fas stimulation does not induce generation of caspase-8 or caspase-9 activity. Caspase-8 activation in AsPC1 cells is only achieved when c-FLIP_S levels are wiped out by CHX, but not by 24 h starvation. In these cells c-FLIP_S levels seem to be the major regulator of caspase-8 activation. The possibility that a sustained increase in the serum starvation time could finally induce the complete inhibition of c-FLIP_S expression can not be excluded. Besides, caspase-8 and caspase-9 activation does not lead to apoptosis in these cells, taking into account that XIAP proteins are acting downstream of caspase-8, it is likely that c-FLIP_S levels, as shown here, and XIAP levels [43] are both involved in the resistance to Fas-induced apoptosis in these cells.

In conclusion, it is known that the different tumor cell lines reported as death receptor apoptosis resistant, have generated different mechanisms to evade apoptosis, and the strategies to drive them to apoptosis have to be different. Here we show that serum starvation is a very good tool to sensitize tumor cells, with different resistant mechanisms, to Fas-induced apoptosis. The phosphorylation state of Akt and ERK 1/2, as well as c-FLIP_S and c-FLIP_L levels play an essential role in blocking the generation of active caspase-8 and serum deprivation can modulate all these steps. Further studies should be carried on to determine the specific signals contained in the serum that control their intracellular levels.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Bantfield for allowing us to use the PBB14 plasmid., Dr. del Peso for the pSFFV-Bcl-2 plasmid and Dr. Renart for the Myr-Akt-HA plasmid. This work was supported by grants from CICYT (SAF 2005-00392) and Mutua Madrileña. Pilar Lopez was the recipient of a fellowship from the MCT.

The abbreviations used here are: Fas, Fas/APO-1/CD95; c-FLIP, FLICE like inhibitory protein; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; U0, U0126; LY, LY294002; Akt, PKB/Akt; CHX, Cycloheximide; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase.

REFERENCES

- [1] S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, *J Exp Med* 169 (1989) 1747-1756.
- [2] B.C. Trauth, C. Klas, A.M. Peters, S. Matzku, P. Moller, W. Falk, K.M. Debatin, P.H. Krammer, *Science* 245 (1989) 301-305.
- [3] F.C. Kischkel, S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer, M.E. Peter, *Embo J* 14 (1995) 5579-5588.
- [4] S. Nagata, *Cell* 88 (1997) 355-365.
- [5] P. Schneider, N. Holler, J.L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana, J. Tschopp, *J Exp Med* 187 (1998) 1205-1213.
- [6] H. Wajant, *Science* 296 (2002) 1635-1636.
- [7] S. Nagata, *Intern Med* 37 (1998) 179-181.
- [8] M. Donepudi, A. Mac Sweeney, C. Briand, M.G. Grutter, *Mol Cell* 11 (2003) 543-549.
- [9] K. Cain, D.G. Brown, C. Langlais, G.M. Cohen, *J Biol Chem* 274 (1999) 22686-22692.
- [10] C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, M.E. Peter, *Embo J* 17 (1998) 1675-1687.
- [11] A.K. Samraj, D. Sohn, K. Schulze-Osthoff, I. Schmitz, *Mol Biol Cell* 18 (2007) 84-93.
- [12] N. Inohara, T. Koseki, Y. Hu, S. Chen, G. Nunez, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 10717-10722.
- [13] M. Irmeler, M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, J. Tschopp, *Nature* 388 (1997) 190-195.

- [14] A. Krueger, I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, S. Kirchhoff, *J Biol Chem* 276 (2001) 20633-20640.
- [15] O. Micheau, M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D.W. Nicholson, C. Briand, M.G. Grutter, *J Biol Chem* 277 (2002) 45162-45171.
- [16] D.W. Chang, Z. Xing, V.L. Capacio, M.E. Peter, X. Yang, *Embo J* 22 (2003) 4132-4142.
- [17] A. Golks, D. Brenner, P.H. Krammer, I.N. Lavrik, *J Exp Med* 203 (2006) 1295-1305.
- [18] S.R. Datta, H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, M.E. Greenberg, *Cell* 91 (1997) 231-241.
- [19] L. del Peso, M. Gonzalez-Garcia, C. Page, R. Herrera, G. Nunez, *Science* 278 (1997) 687-689.
- [20] M.H. Cardone, N. Roy, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, T.F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, J.C. Reed, *Science* 282 (1998) 1318-1321.
- [21] A. Brunet, A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, M.E. Greenberg, *Cell* 96 (1999) 857-868.
- [22] G. Song, G. Ouyang, S. Bao, *J Cell Mol Med* 9 (2005) 59-71.
- [23] G. Kondo, M. Iwase, H. Watanabe, M. Uchida, S. Takaoka, M. Ohashi, D. Ito, M. Nagumo, *Oncol Rep* 14 (2005) 1215-1222.
- [24] D.J. Panka, T. Mano, T. Suhara, K. Walsh, J.W. Mier, *J Biol Chem* 276 (2001) 6893-6896.
- [25] S.M. Uriarte, S. Joshi-Barve, Z. Song, R. Sahoo, L. Gobejishvili, V.R. Jala, B. Haribabu, C. McClain, S. Barve, *Cell Death Differ.* 12 (2005) 233-242.
- [26] C. Rodriguez, M. Pozo, E. Nieto, M. Fernandez, S. Alemany, *Cell Signal* 18 (2006) 1376-1385.
- [27] A.M. Hunter, E.C. Lacasse, R.G. Korneluk, *Apoptosis* (2007)

- [28] B.P. Eckelman, G.S. Salvesen, F.L. Scott, *EMBO Rep* 7 (2006) 988-994.
- [29] S.J. Korsmeyer, *Trends Genet* 11 (1995) 101-105.
- [30] I. Schmitz, H. Weyd, A. Krueger, S. Baumann, S.C. Fas, P.H. Krammer, S. Kirchhoff, *J Immunol* 172 (2004) 2194-2200.
- [31] E. Mezosi, S.H. Wang, S. Utsugi, L. Bajnok, J.D. Bretz, P.G. Gauger, N.W. Thompson, J.R. Baker, Jr., *Mol Endocrinol* 19 (2005) 804-811.
- [32] A.S. Harmala-Brasken, A. Mikhailov, T.S. Soderstrom, A. Meinander, T.H. Holmstrom, Z. Damuni, J.E. Eriksson, *Oncogene* 22 (2003) 7677-7686.
- [33] M.W. Lee, J.H. Bach, H.J. Lee, D.Y. Lee, W.S. Joo, Y.S. Kim, S.C. Park, K.Y. Kim, W.B. Lee, S.S. Kim, *Cancer Invest* 23 (2005) 586-592.
- [34] T. Suhara, T. Mano, B.E. Oliveira, K. Walsh, *Circ Res* 89 (2001) 13-19.
- [35] S.Y. Nam, G.A. Jung, G.C. Hur, H.Y. Chung, W.H. Kim, D.W. Seol, B.L. Lee, *Cancer Sci* 94 (2003) 1066-1073.
- [36] H. Moriyama, S. Yonehara, *Immunol Lett* 109 (2007) 36-46.
- [37] L. Starck, C. Scholz, B. Dorken, P.T. Daniel, *Eur J Immunol* 35 (2005) 1257-1266.
- [38] A. Panner, A.T. Parsa, R.O. Pieper, *Cell Cycle* 5 (2006) 147-150.
- [39] J. Zha, H. Harada, E. Yang, J. Jockel, S.J. Korsmeyer, *Cell* 87 (1996) 619-628.
- [40] A. Suzuki, M. Hayashida, H. Kawano, K. Sugimoto, T. Nakano, K. Shiraki, *Hepatology* 32 (2000) 796-802.
- [41] R.G. Jones, A.R. Elford, M.J. Parsons, L. Wu, C.M. Krawczyk, W.C. Yeh, R. Hakem, R. Rottapel, J.R. Woodgett, P.S. Ohashi, *J Exp Med* 196 (2002) 335-348.
- [42] J.M. Plate, *Leuk Lymphoma* 45 (2004) 1519-1529.
- [43] M. Vogler, K. Durr, M. Jovanovic, K.M. Debatin, S. Fulda, *Oncogene* 26 (2007) 248-257.

Figure 1

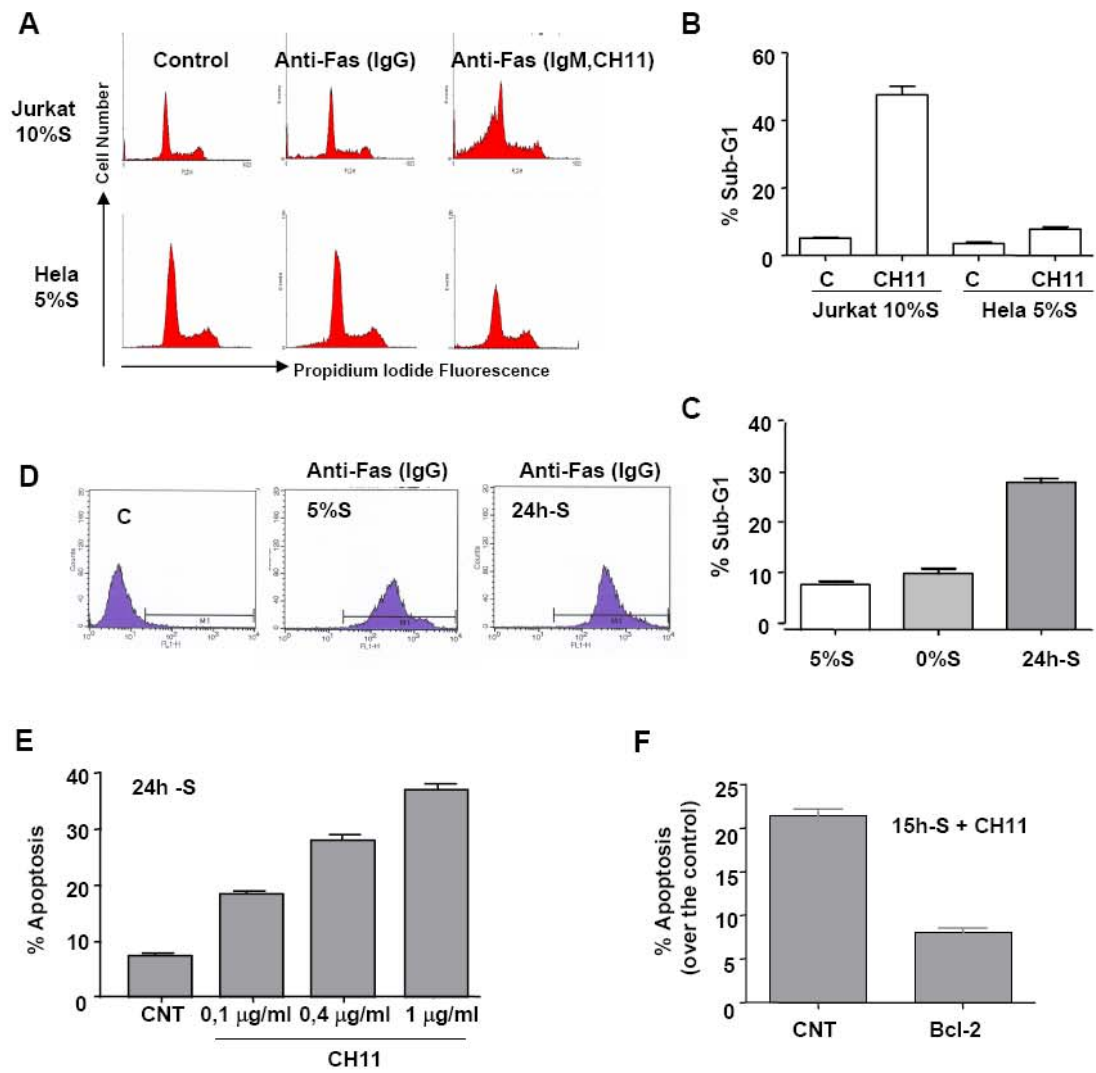


Figure 2

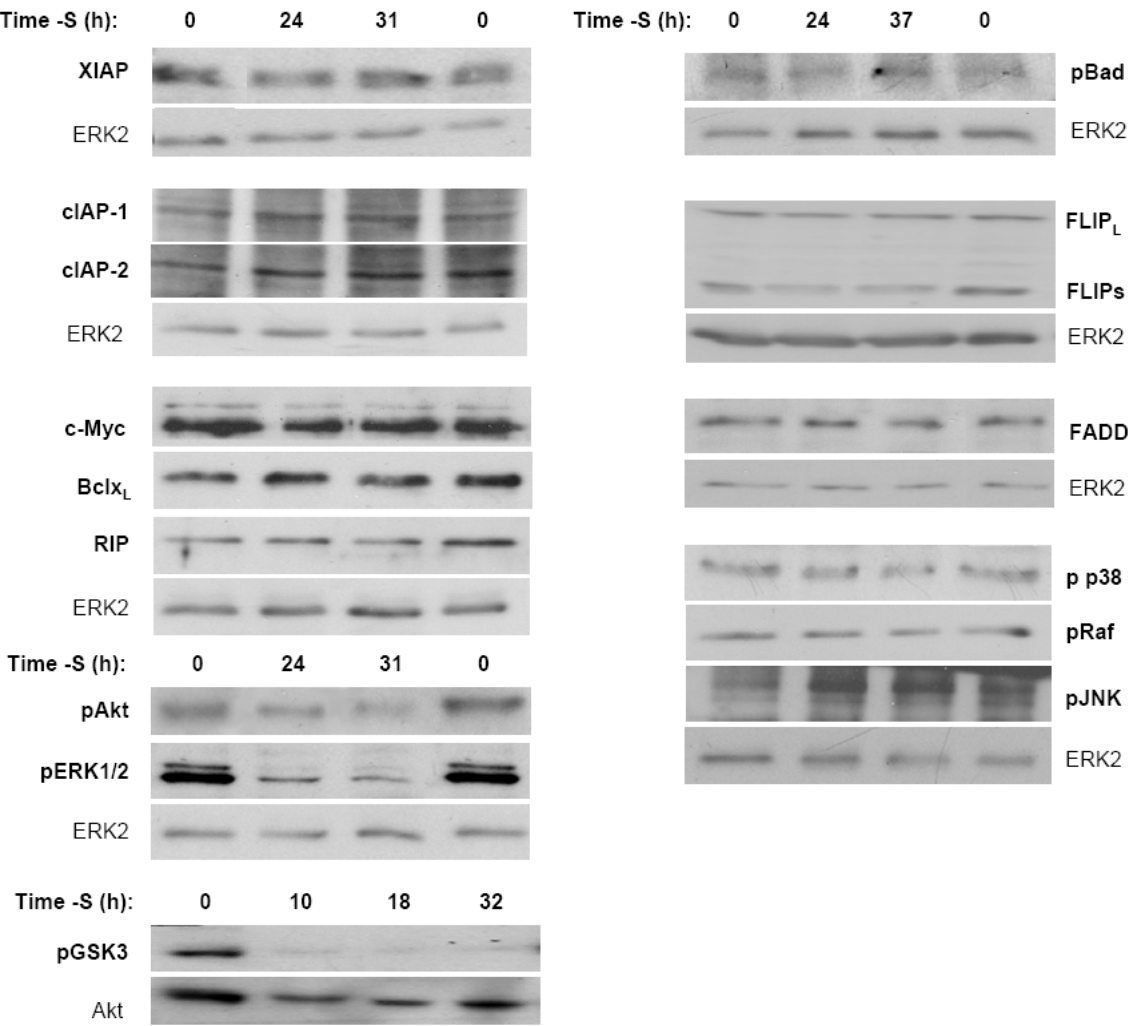


Figure 3

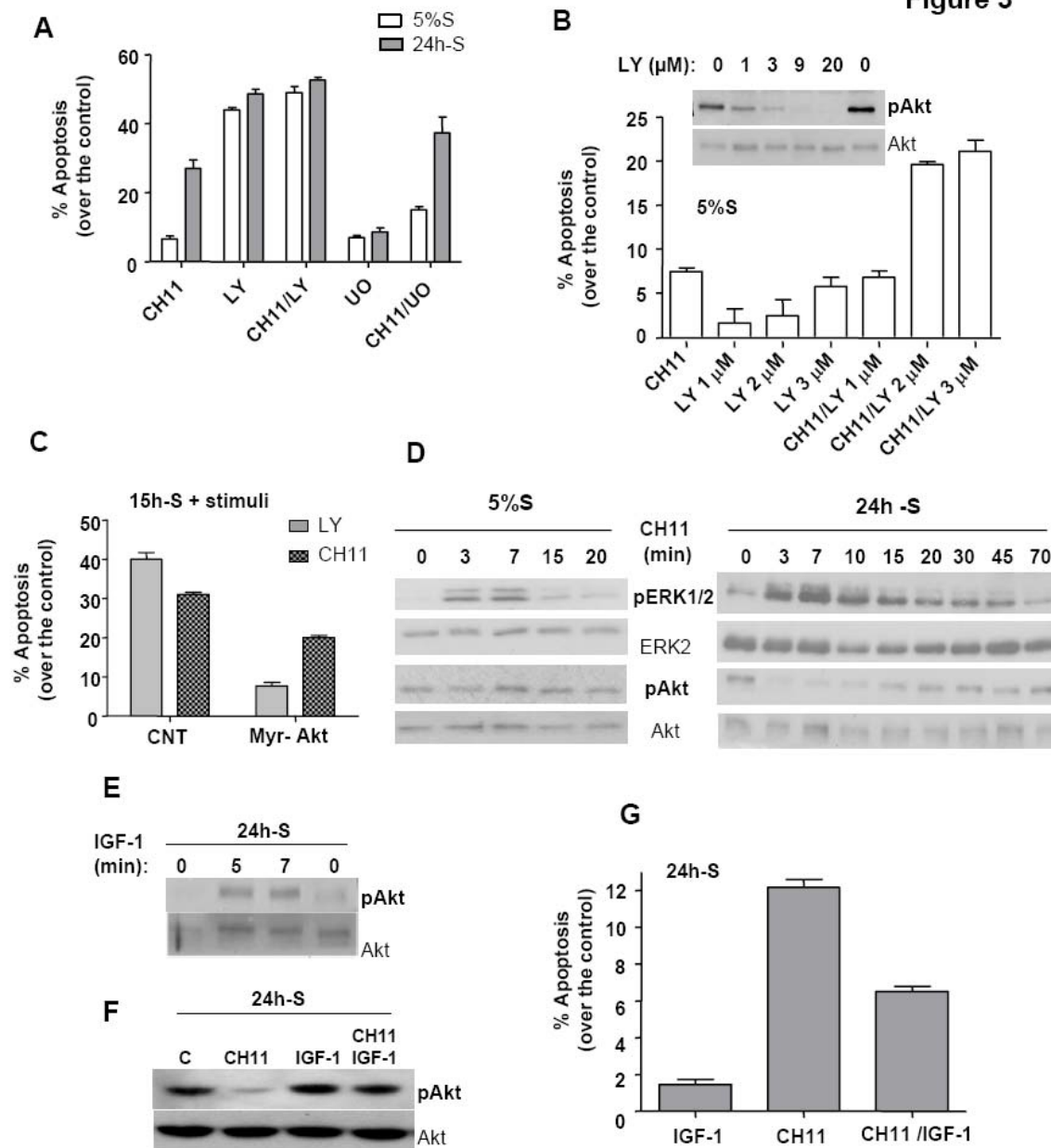


Figure 4

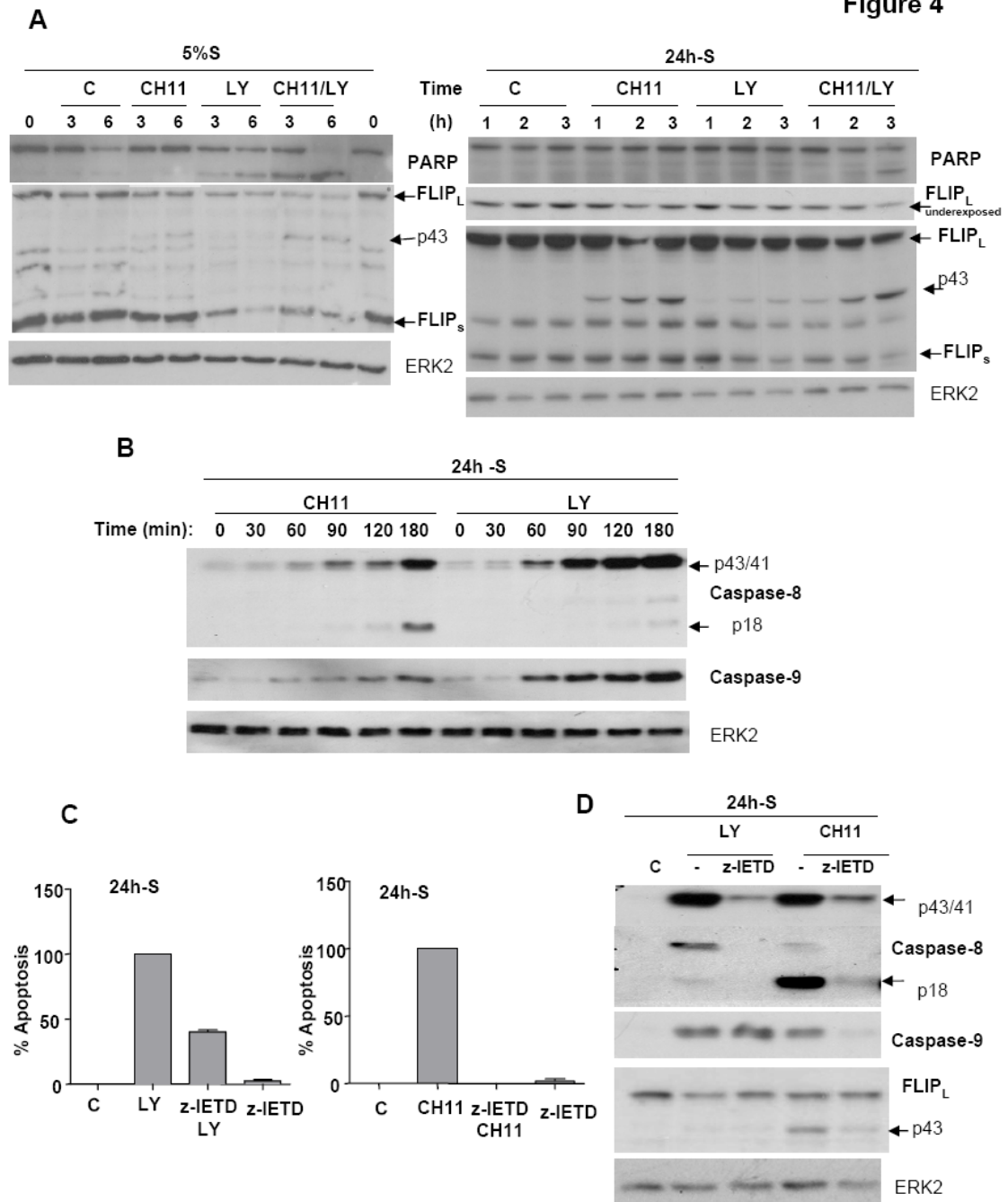
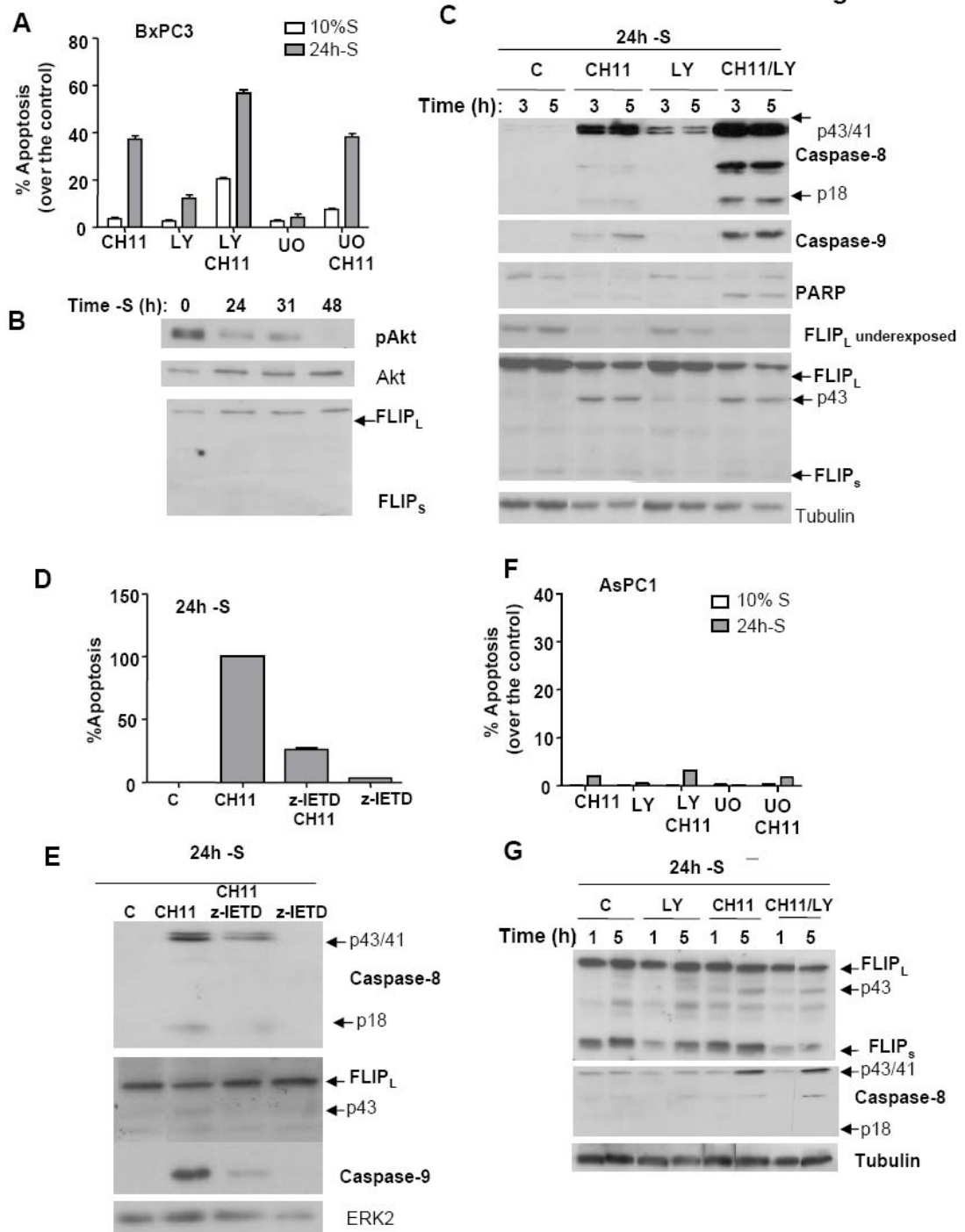
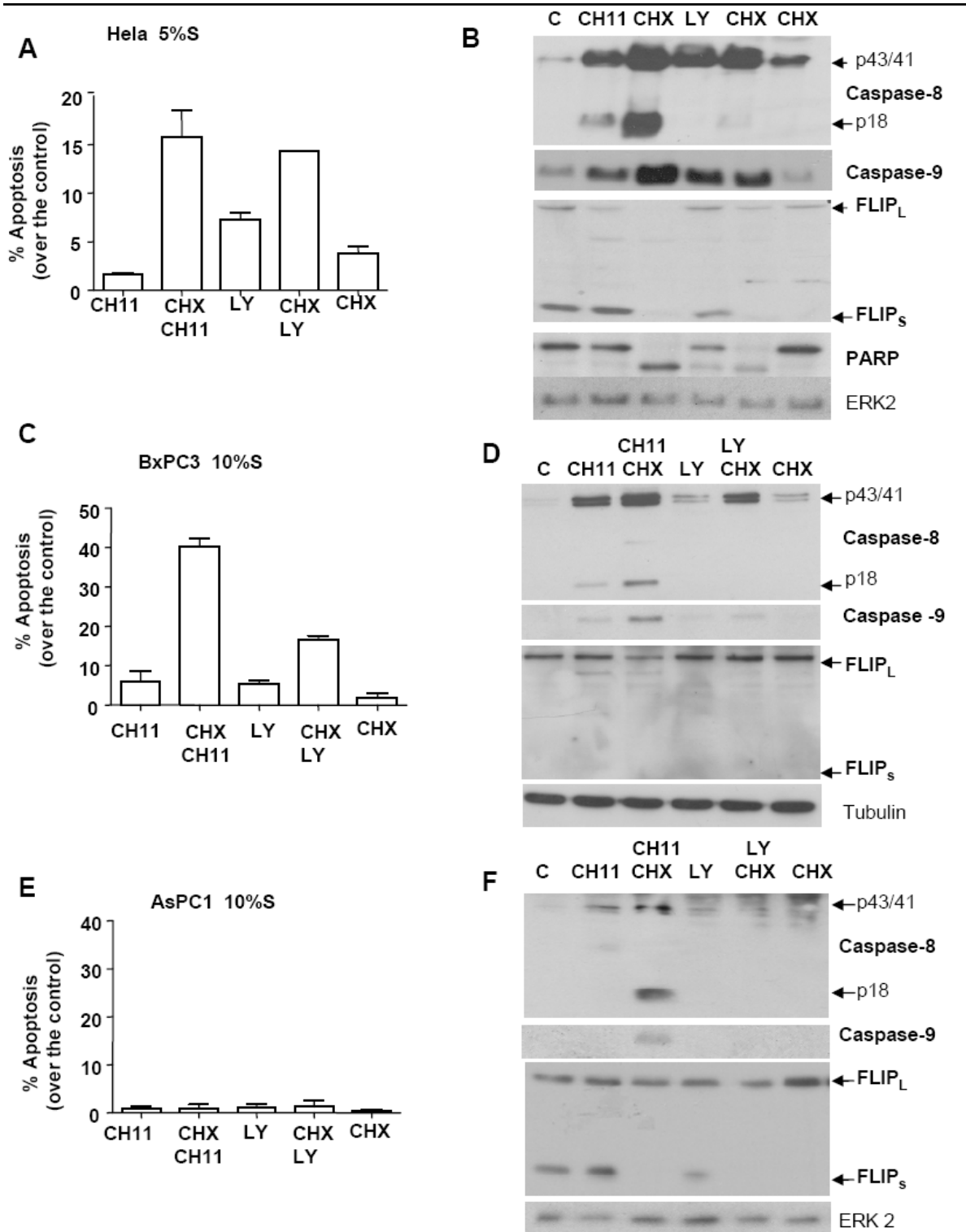


Figure 5





FIGURES LEGENDS

Fig. 1. Serum starvation sensitizes HeLa cells to Fas-induced apoptosis. (A) HeLa and Jurkat cells growing respectively in 5% and 10% serum medium were treated with anti-Fas antibodies (IgG, 400 ng/ml) or (IgM, CH11, 400 ng/ml) for 15 h. Apoptosis was determined by measuring the sub-G1 population using a propidium iodide DNA staining and Flow Cytometry. (B) Quantification of the data obtained is shown. (C) HeLa cells cultured in 5% serum medium (5%S), serum starved at the same time of the stimuli (0%S), or serum starved for 24 h (24h-S) were treated for 18 h with CH11 (400 ng/ml). The percentage of sub-G1 population, measured by FACS analysis, is shown. (D) Fas expression in HeLa cells growing in 5% serum (5%S) or after 24 h serum starvation (24h-S). (E) HeLa cells cultured for 24 h in serum-free medium (24h-S) were incubated with increasing concentrations of CH11. Cells were collected after 18 h of treatment and apoptosis was measured by FACS analysis. The percentage of the sub-G1 population after the treatments is shown. (F) HeLa cells cultured in 5% serum medium were co-transfected with PBB14-GFP and empty vector, or with PBB14-GFP and SFFV-Bcl2, as indicated in Materials and Methods. Forty eight hours after transfection, cells were serum starved and treated with CH11 (400 ng/ml) for 15 h (15h-S + CH11). Apoptosis was determined by measuring the sub-G1 population in PBB14-GFP positive cells by Flow Cytometry. (A, D) Representative data of one of three experiments are shown. (B, C, E, F) Results shown are the average \pm SD of three different experiments.

Fig. 2. Serum starvation in HeLa cells down regulates c-FLIP_s, pAkt, and pERK 1/2 levels. HeLa cells were serum starved for the indicated times and total protein lysates were

analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Representative data of one of three experiments are shown.

Fig. 3. Akt inhibition plays a relevant role in the Fas-promoted apoptosis in HeLa cells.

(A) HeLa cells growing in 5% serum medium (5%S) or serum starved for 24 h (24h-S) were pre-incubated for 30 min with U0 (MEK inhibitor, 10 μ M), or LY (PI3K inhibitor, 20 μ M) and then CH11 (400 ng/ml) was added for 15 h. The percentage of apoptotic cells was determined by Flow Cytometry. **(B)** HeLa cells cultured in 5% serum medium (5%S) were pre-treated for 30 min with different concentrations of LY (1, 2, and 3 μ M) and stimulated or not with CH11 (400 ng/ml) for 15 h. The percentage of apoptotic cells was determined by Flow Cytometry. The effect of LY at different concentrations (0, 1, 3, 9, and 20 μ M) on pAkt levels after 15 h was determined by immunoblotting. **(C)** HeLa cells cultured in 5% serum medium were co-transfected with PBB14-GFP and empty vector (CNT), or with PBB14-GFP and Myr-Akt vectors. Forty eight hours after transfection cells were serum starved and treated with LY (20 μ M) or with CH11 (400 ng/ml) for 15 h (15h-S + stimuli). Apoptosis was determined by measuring the sub-G1 population of the positive GFP transfected cells by Flow Cytometry. **(D)** HeLa cells growing in 5% serum (5%S) or 24 h serum starved (24h-S) were treated with CH11 (400 ng/ml) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blot with anti-pERK 1/2 and anti-pAkt antibodies, the same membranes were stripped and incubated with anti-Akt or anti-ERK 2 antibodies as loading controls. **(E)** HeLa cells, serum starved for 24 h (24h-S), were treated with IGF-1 (300 ng/ml) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blot using anti-pAkt and anti-Akt as loading control. **(F)** HeLa cells starved for 24 h (24h-S) were pre-treated or not with IGF-1 (300 ng/ml) for 10 min and then stimulated with CH11 (400 ng/ml) for 5 min. Cells lysates were analyzed by Western blot as in (E). **(G)** HeLa cells were

starved for 24 h (24h-S), pre-treated with IGF-1 (300 ng/ml) for 10 min and then stimulated with CH11 (400 ng/ml) for 15 h. Apoptosis was measured by Flow Cytometry. (A, B, C, G) Results shown are the average \pm SD of three different experiments. (D, E, F) Show one representative data of three experiments are shown.

Fig. 4. Activation of caspase-8 and caspase-9 in the apoptosis promoted by LY and Fas in HeLa cells. (A) HeLa cells cultured in 5% serum (5%S) or serum starved for 24 h (24h-S) were stimulated with CH11 (400 ng/ml), with LY (20 μ M) or with both stimuli together for the indicated times. Cell lysates were immunoblotted with antibodies anti-PARP, anti-FLIP, and anti-ERK2 as loading control. (B) HeLa cells were serum starved for 24 h (24h-S) and treated with CH11 (400 ng/ml) or LY (20 μ M) for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blot with antibodies anti-caspase-8, anti-caspase-9, or anti-ERK 2 antibody as loading control. (C) HeLa cells 24 h serum starved (24h-S), were pre-incubated for 30 min with the caspase-8 inhibitor z-IETD-fmk, (z-IETD, 2.2 μ M), and then treated with CH11 (400 ng/ml) or LY (20 μ M). Apoptosis was measured by Flow Cytometry analysis 15 h after the treatments. The 100% value is given to the apoptotic cells obtained in the absence of caspase-8 inhibitor. (D) Total protein lysates of cells treated as in (C) for 3 h were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. (A, B, D) Representative data of one of three experiments are shown. (C) Results shown are the average of three different experiments.

Fig. 5. Serum starvation sensitizes BxCP3 cells to Fas-induced apoptosis. (A) BxPC3 cells growing in 10% serum medium (10%S) or maintained in serum starved for 24 h (24h-S) were treated with CH11 (400 ng/ml), LY (20 μ M), U0 (10 μ M) or with CH11 plus LY as well as with CH11 plus U0. The percentage of apoptotic cells, after 15 h of treatment, was

determined by Flow Cytometry. **(B)** BxPC3 cells were serum starved for the indicated times. Total protein lysates were analysed by Western blot with the antibodies indicated in the Figure. **(C)** BxPC3 cells, serum starved for 24 h (24h-S) were treated with LY (20 μ M), CH11 (400 ng/ml) or with both stimuli together for the indicated times. Cell lysates were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Anti-tubulin was used to measure loading of the gel. **(D)** BxPC3 cells, serum starved for 24 h (24h-S), were pre-incubated or not with z-IETD (2.2 μ M) for 30 min and treated or not with CH11 (400 ng/ml). Cells were collected after 15 h treatment and apoptosis was measured by Flow Cytometry analysis. The 100% value is given to the apoptotic cells obtained in the absence of caspase-8 inhibitor. **(E)** BxPC3 cells treated as in (D) were collected after 3 h and cell lysates were analyzed by Western blot with the indicated antibodies. Anti-ERK 2 antibody was used to measure loading of the gel. **(F)** AsPC1 were cultured in 10% serum medium (10%S) or in absence of serum for 24 h (24h-S) were stimulated with CH11 (400 ng/ml), LY (20 μ M), U0 (10 μ M) or with CH11 plus LY as well as with CH11 plus U0. The percentage of apoptotic cells were determined by Flow Cytometry. **(G)** AsPC1 cells serum starved for 24 h (24h-S), were treated with CH11 (400 ng/ml), LY (20 μ M) or both stimuli together for the indicated times. Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. (A, D, F) Results shown are the average \pm SD of three different experiments. (B, C, E, G) Representative data of one of three experiments are shown.

Fig. 6. Regulation of caspase-8 activation and apoptotic induction by CHX treatment in HeLa, BxCP3, and AsPC1 cells stimulated by Fas or by LY. HeLa, BxPC3, and AsPC1 cells cultured in presence of serum were treated with CH11 (400 ng/ml), LY (20 μ M), CHX (10 μ M) or with CHX plus CH11 as well as with CHX plus LY. **(A, C, E)** Cells were collected after 6 h treatment and apoptosis was determined by measuring the sub-G1

population by Flow Cytometry. Total protein lysates obtained from HeLa **(B)**, BxPC3 **(D)**, or AsPC1 **(F)** after 4 h treatment, were analyzed by Western blot with anti-caspase-8, anti-caspase-9, anti-FLIP or anti-PARP antibodies. Total anti-ERK 2 and anti-tubulin were determined as loading control. (A, C, E) Results shown are the average \pm SD of three different experiments. (B, D, F) Representative data of one of three experiments are shown.

The COOH-Terminal Domain of Wild-Type Cot Regulates Its Stability and Kinase Specific Activity

Maria Luisa Gándara, Pilar López, Raquel Hernando, José G. Castaño,
and Susana Alemany*

*Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols," Consejo Superior de Investigaciones Científicas,
Facultad Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain*

Received 2 May 2003/Returned for modification 17 June 2003/Accepted 15 July 2003

Cot, initially identified as an oncogene in a truncated form, is a mitogen-activated protein kinase kinase kinase implicated in cellular activation and proliferation. Here, we show that this truncation of Cot results in a 10-fold increase in its overall kinase activity through two different mechanisms. Truncated Cot protein exhibits a lower turnover rate (half-life, 95 min) than wild-type Cot (half-life, 35 min). The degradation of wild-type and truncated Cot can be specifically inhibited by proteasome inhibitors *in situ*. The 20S proteasome also degrades wild-type Cot more efficiently than the truncated protein. Furthermore, the amino acid 435 to 457 region within the wild-type Cot COOH-terminal domain confers instability when transferred to the yellow fluorescent protein and targets this fusion protein to degradation via the proteasome. On the other hand, the kinase specific activity of wild-type Cot is 3.8-fold lower than that of truncated Cot, and it appears that the last 43 amino acids of the wild-type Cot COOH-terminal domain are those responsible for this inhibition of kinase activity. In conclusion, these data demonstrate that the oncogenic activity of truncated Cot is the result of its prolonged half-life and its higher kinase specific activity with respect to wild-type Cot.

The Cot/tpl-2 gene encodes a mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase kinase that is potentially capable of switching on several MAP kinase cascades, namely those leading to the activation of the MAP kinases ERK1/ERK2, JNK, p38 γ , and ERK5 (13, 20, 25, 38, 47, 53). These signal transduction pathways link Cot activity with the up-regulation of several transcription factors, such as AP-1 (7, 13, 25), NFAT (7, 17, 62), NF- κ B (8, 31, 38, 63), CREB (22), or E2F (65). As a result, Cot activity has been implicated in cellular activation as well as cell proliferation through the regulation of the cell cycle transitions G₀/G₁ and G₁/S (6, 7, 20, 46, 54, 63, 65).

Cot has also been implicated in cellular transformation, as the genomic locus of the Cot gene is amplified in some human breast cancers (58) and malignant human Hodgkin/Reed-Sternberg cells exhibit abnormally high expression levels of Cot protein (21). The human Cot gene was originally identified in its truncated form, which is present in transformed SHOK cell foci obtained by the transfection of the genomic DNA from a human thyroid carcinoma cell line (42). This truncation unmasks the transforming capacity of this proto-oncogene, a property of the truncated Cot protein (trunc-Cot) in which the last 69 amino acids of the wild-type (wt) COOH-terminal (C-terminal) domain are replaced by an unrelated 18-amino-acid sequence (42). Nevertheless, it has since been shown that overexpression of the proto-oncogenic form is also capable of conferring a transformed phenotype to established cell lines (12, 13).

The rat homologue of the human Cot gene is the tpl-2 gene. Disruption of the last coding exon of tpl-2, due to the insertion

of the Moloney leukemia provirus (MLV), leads to the expression of a truncated protein where the final 44 amino acids of the C-terminal domain of the normal cellular protein are replaced by a 10-amino-acid fragment of unrelated sequence. The truncation of the tpl-2 gene by the MLV insertion also unmasks its oncogenic potential (11, 40, 46). The C-terminal domains of both wt Cot and tpl-2 are almost identical. The only difference between the last 77 C-terminal amino acids of the human wt Cot and tpl-2 are the two conservative substitutions M437 for V and K439 for R. However, there is no similarity in the amino acids inserted in either trunc-Cot or trunc-tpl-2. Similarly, integration of the mouse mammary tumor provirus (MMTV) in the last intron of the mouse tpl-2 gene has also been implicated in epithelial cell transformation (23).

The tightly regulated expression of short-lived proteins implicated in specific signal transduction pathways is essential for the correct control of proliferation. Moreover, a deregulation of the turnover of these proteins can trigger transformation (34). Many such proteins are degraded by the proteasome (14, 27, 32, 34, 67), and an important aspect of their degradation is the identification of signals responsible for their efficient targeting to the proteasome machinery (68). Indeed, this kind of highly regulated degradation of specific proteins is often mediated by discrete regions of their primary sequences known as degrons (64). In most instances, a degron can function autonomously when inserted within the sequence of a heterologous protein, triggering to degradation the fusion protein by the same mechanisms that operate in the original substrate (24, 29, 33). The vast majority of proteins degraded by the proteasome are first modified by a set of enzymes that attach multiple copies of ubiquitin (for a review, see references 28 and 59). However, there are proteins, such as p21^{waf1} (60), ornithine decarboxylase (15, 66), casein (50), myelin basic protein (3,

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-UAM, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain. Phone: 34-91-3975418. Fax: 34-91-5854401. E-mail: salemayn@iib.uam.es.

39), and I κ B (36), that can be degraded via the proteasome without prior ubiquitylation.

In this paper, we demonstrate that the C-terminal domain of wt Cot regulates its kinase activity by two different mechanisms. The amino acids 435 to 457 within the C-terminal domain of wt Cot contain a signal that targets this protein to proteasome degradation. Thus, wt Cot is expressed at steady-state levels that are 2.6-fold lower than those of trunc-Cot. On the other hand, wt Cot exhibits 3.8-fold lower specific kinase activity than trunc-Cot, indicating that the region encompassed by the amino acid 425 to 467 region within the C-terminal domain exercises an inhibitory control on its kinase activity. Consequently, transfected trunc-Cot cells exhibit a 10-fold-higher Cot activity per mg of total protein and a greater capacity to produce cell transformation than wt Cot transfected cells. These results provide an explanation of the molecular basis for the enhanced transformation capability of the trunc-Cot protein.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids. pcINEO HA-wt Cot (1 to 467), pcINEO HA-trunc-Cot, pcINEO HA plasmids (65), pEF-BOS wt Cot, pEF-BOS trunc-Cot (6, 7), and -73 pcol-Luc (7) have all been described previously. The GST-Cot₃₉₀₋₄₆₇ construct containing the C-terminal domain of wt Cot fused to the C terminus of glutathione S-transferase (GST) was constructed by subcloning a PCR fragment of wt Cot into the pGEXAT3-GST plasmid (Amersham-Pharmacia-Biotech). The sequences of the primers used were as follows: F, 5'-GGCCCTGAAATCGCCC AGAG (where the lowercase letters indicate the mismatches to generate the EcoRI site for cloning); and R, 5'-CAAGACGACGcAgcTGGTTGTCCCGG (where the lowercase letters indicate the mismatches to generate the SalI site for cloning). The EcoRI- and SalI-digested PCR product was also inserted into the pEYFP-C1 plasmid (Clontech) to obtain EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇, in which the C-terminal (390 to 467) of wt Cot is fused to the C terminus of EYFP. The different HA-Cot and EYFP-Cot constructs, with different stop codons (namely HA-Cot₄₅₇ or EYFP-Cot₃₉₀₋₄₅₇, HA-Cot₄₄₆ or EYFP-Cot₃₉₀₋₄₄₆, HA-Cot₄₃₅ or EYFP-Cot₃₉₀₋₄₃₅, and HA-Cot₄₂₄ or EYFP-Cot₃₉₀₋₄₂₄) were generated by in vitro-directed mutagenesis using the QuikChange directed mutagenesis kit and the following primers, respectively: forward (F) 5'-GGCTACTTCAATCTTga CGGGGACCACCAACGCTT-3' and reverse (R) 5'-AAGCGTGTGGTGGTCC CCGTcaAAAGATTGAAGTAGCC-3'; F 5'-CGCTCTCTC TACATCAaCTC GCGCTCTGGCTGGCTAC-3' and R 5'-GTAGCCAGCCAGAGCGCCGA GTaGATGTAGAGAGAGCG-3'; F 5'-GGAAGCACCAGGAATCTAGA TGCTCAAGAGCAA-3' and R 5'-TTGCTCTTGATCATCTaAGATTCTT CGGTGCTTCC-3'; and F 5'-GAGAACATTGCTTaTCTCTGTGCACAGGA AGCACC-3' and R 5'-CGGTGCTTCTCTGTGCACGAAGATaAGCAATG TTCT-3' (where the lowercase letters indicate the mismatches to generate the stop codon). EYFP-Cot₄₄₅₋₄₅₇ was constructed by subcloning into the pEYFP-C1 plasmid the 5'-phosphorylated oligonucleotides F (5'-gatcATCGACCTCGCG CTCTGGCTGGCTACTTCAATCTTTAG, where the lowercase letters indicate the sequence for ligation to the BglII site) and R (5'-tcgaCTAAAGATTGAAG TAGCCAGCCAGAGCGCCGAGGTGCGATA, where the lowercase letters indicate the sequence for ligation to the SalI site), which contain the nucleotides corresponding to amino acids 445 to 457 of wt Cot. To obtain the three different constructs EYFP-Cot₄₁₄₋₄₅₇, EYFP-Cot₄₂₆₋₄₅₇, and EYFP-Cot₄₃₅₋₄₅₇, the HA-Cot₄₅₇ construct was used as a template to generate mutants with a BglII site in the nucleotides corresponding to amino acids 413, 425, and 434. The different mutants were obtained by in vitro mutagenesis using the following primers: to generate the 413 BglII site, primers F (5'-AAGAGGCTGCTGAGTAGatcGA GCTGGAACCTTCT) and R (5'-AGGAAGTTCCAGctcGATCTACTCAGC AGCTCTT); to generate the 425 BglII site, primers F (5'-CTTCTGTGACAG ATTGCTagaTCTTCTGTGCACAGGAAGC) and R (5'-GCTTCTGTGACAG AAGAtcAGCAATGTCTCAGGA); and to generate the BglII site at amino acid 434, primers F (5'-ACAGGAAGCACCAGagATCTGAGATG CTCAA GAGG) and R (5'-CTCTTGTGACATCTCAGAtcTCTCGGTGCTTCTGT) (where the lowercase letters indicate the mismatches to generate the BglII sites). These three different HA-Cot₄₅₇ constructs with a new BglII site in the nucleotide corresponding to amino acid 413, 425, or 434 were subjected to digestion with BglII and SalI, and the three cDNA fragments were inserted in the

pEYFP-C1 polylinker plasmid previously digested with BglII and SalI. All the constructs were verified by automatic DNA sequencing. The pCMV-His-ubiquitin construct was a generous gift of Dirk Bohmann and has been described previously (61). HA-PKB-DD and PKB-CaaX were generous gifts from Balduino Burgering (19). The -73 pcol-Luc plasmid has been described previously (reference 7 and references therein).

Cell transfection, labeling, and immunoprecipitation. HEK293 cells (American Type Culture Collection) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in a humidified atmosphere of 10% CO₂-90% air. The cells were grown in 100-mm dishes and were transfected at 50% confluency. The transfection assays, unless otherwise indicated, were performed with 10 µg of DNA per 100-mm dish using the DEAE-dextran-chloroquine method. Inhibition of proteases was achieved by incubating the cells, 14.5 h after transfection, with different protease inhibitors for 7.5 h. The final concentrations of the protease inhibitors were as follows: 20 µM E64 (Boehringer Mannheim), 1 mM pepabloc AEBSF (Boehringer Mannheim), 20 µM phosphoramidon (Calbiochem), 10 µM Z-AAF-CMK (Biomol), 20 µM MG132 or 10 µM lactacystin (Calbiochem), and 20 µM LLMet (Sigma-Aldrich). The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 (50 µM; Calbiochem) was added to the cells 2 h after transfection, and 8 h before lysis the cell medium was changed and a mixture containing 50 µM LY294002, 100 µg of cycloheximide/ml with or without 10 µM lactacystin was added to the cells. For metabolic labeling, cells were cultured in methionine-, cysteine-, and glutamine-free DMEM for 20 min and then exposed to a 20-min pulse with 250 µCi of [³⁵S]methionine and [³⁵S]cysteine labeling mixture (Amersham-Pharmacia-Biotech)/ml. Subsequently, the cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.8 mM methionine, and 0.3 mM cysteine for the chase periods indicated in the figures. The proteasome inhibitors MG132 (20 µM) or lactacystin (10 µM) were added 2 h before the pulse and maintained during the chase periods as described previously (35). The radiolabeled cells were then washed twice with 10 ml of ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in 200 µl of ice-cold lysis buffer (50 mM HEPES [pH 7.4], 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 3 mM okadaic acid, 10 µg of pepstatin A/µl, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] plus 1 Complete mini inhibitors tablet [Roche]/10 ml). The cell lysates were centrifuged at 24,100 × g for 10 min at 4°C, and the supernatants, containing the same amount of protein (400 to 900 µg), were subjected to immunoprecipitation with the anti-hemagglutinin (anti-HA) antibody covalently bound to protein A-agarose for 2 h at 4°C. The protein A-agarose was then washed once with ice-cold HNTG buffer (20 mM HEPES [pH 7.5], 10% glycerol [vol/vol], 0.1% Triton X-100) plus 200 mM NaCl and twice with the HNTG buffer plus 150 mM NaCl. The immunoprecipitated proteins were denatured with sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer and separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on a 10% gel. After drying the gel, the radiolabeled proteins were visualized and quantified with an Instant Imager (Perkin-Elmer). To determine the amounts of immunoprecipitated proteins, immunoblotting was performed with anti-Cot antibodies using 50 µg of the distinct initial supernatants and the first supernatant after removal of the immunoprecipitated Cot, as described below. About 90% of the trunc-Cot and wt Cot was immunoprecipitated under the conditions described above.

Western blotting. The transfected cells contained in one 100-mm dish were washed with ice-cold PBS and divided into two halves. One half of the cells was lysed in 200 µl of ice-cold lysis buffer and centrifuged at 24,100 × g for 10 min at 4°C. A total of 35 µg of protein from the supernatants of these cells was resolved by SDS-10% PAGE (soluble proteins). The pellets from the above extraction were directly solubilized in SDS loading buffer, and the volume corresponding to the same amount of soluble protein was also loaded onto an SDS-10% PAGE (insoluble proteins). The other half of the cells was directly resuspended in SDS loading buffer, and the volume corresponding to the same amount of soluble proteins was also subjected to electrophoresis in SDS-10% PAGE gels (total proteins). The separated proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and probed with polyclonal anti-Cot (6), monoclonal anti-Cot (Calbiochem), or monoclonal anti-HA (Babco) antibodies. As a control of protein loading in the SDS-PAGE gels, the PVDF membranes were also probed with a polyclonal anti-protein disulfide isomerase (PDI) antiserum as described previously (44). Antibodies against ubiquitin were purchased from Dako, and those against enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) were from Clontech. Western blotting for phospho-Erk (P-Erk) and total Erk-2 was performed with specific anti-P-Erk (Santa Cruz) and anti-Erk-2 (Zymed) antibody, respectively. The anti-GST antibody was purchased from Sigma. The blots were developed using chemiluminescence (ECL; Amersham-Pharmacia-Biotech), and the signals were quantified by optical densitometry using NIH Image 1.6 unless otherwise indicated.

RT-PCR. Total RNA was isolated from cells transfected with pcINEO HA-wt Cot HA-trunc-Cot and pcINEO HA (20 h after transfection) with TRIzol (Gibco-BRL) according to the manufacturers' instructions. Two micrograms of total RNA was subjected to reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis as described previously (65), using β -actin primers as internal control.

AP-1-driven transcription assay. Different concentrations of pEF-BOS wt Cot, pEF-BOS trunc-Cot (0.01, 0.03, 0.1, or 0.3 μ g), normalized for the amount of DNA with empty pEF-BOS, or 0.15 μ g of the different pcINEO Cot constructs were cotransfected together with 0.15 μ g of -73 pcol-Luc into HEK293 cells. Twenty hours after transfection Luc activity was measured as described previously (7).

Cot kinase assay. Cot kinase assays were performed as described previously (1, 53), but with some minor modifications. Cells transfected with pcINEO HA-Cot constructs and pcINEO HA for 20 h were lysed in 500 μ l of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% [vol/vol] Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate [pH 10], 10 mM sodium glycerophosphate [pH 7.4], 5 mM sodium pyrophosphate, 0.27 mM sucrose, 0.1% [vol/vol] β -glycerophosphate, 0.1% β -mercaptoethanol, 1 mM microcystin-LR, 1 mM benzamide, plus 1 Complete mini inhibitors tablet/10 ml [Roche]) and centrifuged at $24,100 \times g$ for 10 min at 4°C. Ten micrograms of the different supernatants was incubated for 2 h with the anti-HA antibody covalently bound to protein A-agarose. The proteins immunoprecipitated were washed twice with ice-cold lysis buffer plus 0.5 M NaCl, once with ice-cold lysis buffer, and finally with ice-cold 50 mM Tris HCl (pH 7.5), 0.1 mM EGTA, 0.03% Brij, 0.1% (vol/vol) β -mercaptoethanol. The agarose beads were then incubated in a final volume of 20 μ l containing 12.5 mM Tris (pH 7.5), 0.0075% Brij, 0.025 mM EGTA, 0.0158 μ g of MKK1/ μ l, 0.033 μ g of MAPK/ μ l, 0.0025 mM microcystin-LR, 0.067 mM sodium orthovanadate, 0.025% (vol/vol) β -mercaptoethanol. The kinase reaction was then started by adding a mixture of ATP and $MgCl_2$ to final concentrations of 330 μ M and 6.5 mM, respectively, and was left to continue for 15 min at 30°C with agitation. During this period of time the kinase reaction was linear. Two microliters of this kinase reaction was then used for the second kinase assay, and the rest of the volume (18 μ l) was subjected to Western blot analysis as described above. The second kinase reaction was carried out in a final volume of 50 μ l: 2 μ l of the first kinase reaction mixture, 37.5 mM Tris HCl (pH 7.5), 0.75 mM sodium orthovanadate (pH 10), 0.75 mM EGTA, 0.25 mg of myelin basic protein/ml, and 0.75% (vol/vol) β -mercaptoethanol. The reaction was started by adding a mixture of ATP and $MgCl_2$ to a final concentration of 100 μ M and 10 mM, respectively, and contained 1.66 μ Ci of [γ - 32 P]ATP. The reaction was incubated for 10 min at 30°C with shaking and stopped by spotting 40 μ l of this mixture onto P81 Whatmann disk filters. The filters were dropped into a 75 mM phosphoric acid solution, washed extensively in the same solution, and dried after a final acetone wash. The 32 P incorporated into myelin basic protein was quantified by Cerenkov counting. Under these reaction conditions, the incorporation of 32 P into myelin basic protein was linear within the time span of the assay. We defined 1 U of Cot kinase activity as 1 nmol of phosphate incorporated into myelin basic protein in 1 min. The specific activity is expressed as millionths of Cot activity divided by the amount of Cot protein.

Focus-forming transformation assays. NIH 3T3 cells grown in 100-mm dishes were transfected with 10 μ g of wt Cot, trunc-Cot, or the empty vector using the Lipofectin reagent according to the manufacturers' instructions (Life Technologies, Inc.). The day after transfection, the cells were kept in medium supplemented with 10% filtered calf serum. After 2 weeks, the cells were washed twice in PBS, pH 7.4, fixed for 10 min in 75% methanol-25% acetic acid, stained for 1 min with 0.4% crystal violet in 20% ethanol, and washed extensively with water until the excess stain was removed. All transfections were done in duplicate.

In vitro degradation assays. Transcription-translation assays were performed with the pcINEO HA-wt Cot and pcINEO HA-trunc-Cot constructs using the TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega) and [35 S]methionine and [35 S]cysteine, according to the manufacturer's instructions. Degradation reactions were performed in a final volume of 20 μ l containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1 μ l of corresponding labeled kinase, and 0.2 to 0.4 μ g of purified rat liver 20S proteasome (5). Control reaction mixtures contained either no proteasome or proteasome plus 20 μ M MG132 or 10 μ M lactacystin. Each reaction was terminated by adding SDS loading buffer, and the samples were resolved on SDS-10% PAGE gels and vacuum dried. The radio-labeled proteins were visualized and quantified by Instant Imager analysis (Perkin-Elmer). Degradation assays were also performed with 1.5 μ g of recombinant GST-Cot₃₉₀₋₄₆₆ or with 1.5 μ g of recombinant GST. After the in vitro degradation reactions, GST-Cot₃₉₀₋₄₆₆ and GST were visualized in SDS-10% PAGE gels stained either with Coomassie blue or immunoblotted with anti-Cot antibody or anti-GST-antibodies as described above.

RESULTS

trunc-Cot exhibits higher levels of steady-state expression than wt Cot. In order to determine the steady-state expression of wt Cot and trunc-Cot, we analyzed the amounts of these proteins in total extracts of HEK293 cells 24 h after transfection with 10 μ g of pcINEO HA-wt Cot, pcINEO HA-trunc-Cot, or pcINEO HA. In Western blots, it was apparent that these cells expressed higher steady-state levels of trunc-Cot than wt Cot (Fig. 1A). However, RT-PCR analysis of the same transfected cells indicated that the mRNA levels of both wt Cot and trunc-Cot were very similar (Fig. 1B). The higher levels of protein expression of transfected trunc-Cot were observed with two different anti-Cot antibodies as well as with an anti-HA antibody, and the quantification of 10 independent experiments indicated that the expression of trunc-Cot was $2.6\text{-fold} \pm 0.4$ fold (mean \pm standard deviation) higher than the steady-state levels of wt Cot.

The steady-state expression levels of wt Cot and trunc-Cot proteins were also examined at different times after transfection (12, 24, 36, and 44 h). Moreover, the Western blot analyses of the wt Cot and trunc-Cot proteins were performed with total cell extracts as well as with the 1% NP-40-soluble and -insoluble fractions from transfected cells. As expected, in total cell extracts the expression levels of both wt Cot and trunc-Cot proteins increased with time. However, at all times after transfection, more trunc-Cot accumulated in the cells than wt Cot (Fig. 1C). The higher expression levels of trunc-Cot were also observed after transfection of equal amounts of wt Cot and trunc-Cot plasmids in other cell lines (Jurkat, Cos-7, and HeLa) and appeared to be independent of the transfection method (DEAE-dextran, calcium-phosphate, Lipofectamine, or electroporation) or the type of vector (pcINEO or pEF-BOS). Nor was this effect influenced by the type of fusion protein transfected, as the difference in levels was also observed without tag or GST fused to wt Cot and to trunc-Cot (data not shown). The higher expression levels of trunc-Cot compared to wt Cot in the 1% NP-40-soluble fraction could be detected at different times after transfection (Fig. 1C). Furthermore, 24 h after transfection both wt Cot and trunc-Cot proteins appeared in the 1% NP-40-insoluble fraction (Fig. 1C), and the wt Cot and trunc-Cot from this fraction were only partially solubilized after treatment with 6 M guanidinium chloride (data not shown). Cytoplasmic aggregates of trunc-Cot and wt Cot could be detected by immunocytochemistry in HEK293 and Cos-7 cells 48 h after transfection with HA-trunc-Cot or HA-wt Cot, probably due to this insoluble protein fraction (data not shown). As a consequence, we performed all the subsequent experiments 14 to 20 h after cell transfection, when both wt Cot and trunc-Cot are completely soluble in 1% NP-40.

trunc-Cot is more slowly degraded than wt Cot. The higher protein expression levels of trunc-Cot compared to wt Cot could indicate that the truncated protein has a lower degradation rate. Thus, we carried out pulse-chase experiments in HEK293 cells 14 h after their transfection with pcINEO HA-wt Cot or pcINEO HA-trunc-Cot, and the $t_{1/2}$ values for both proteins were determined. The radioactivity incorporated into wt Cot and trunc-Cot after a 20-min pulse was measured, as was its decay during the different periods of chase (0 to 240

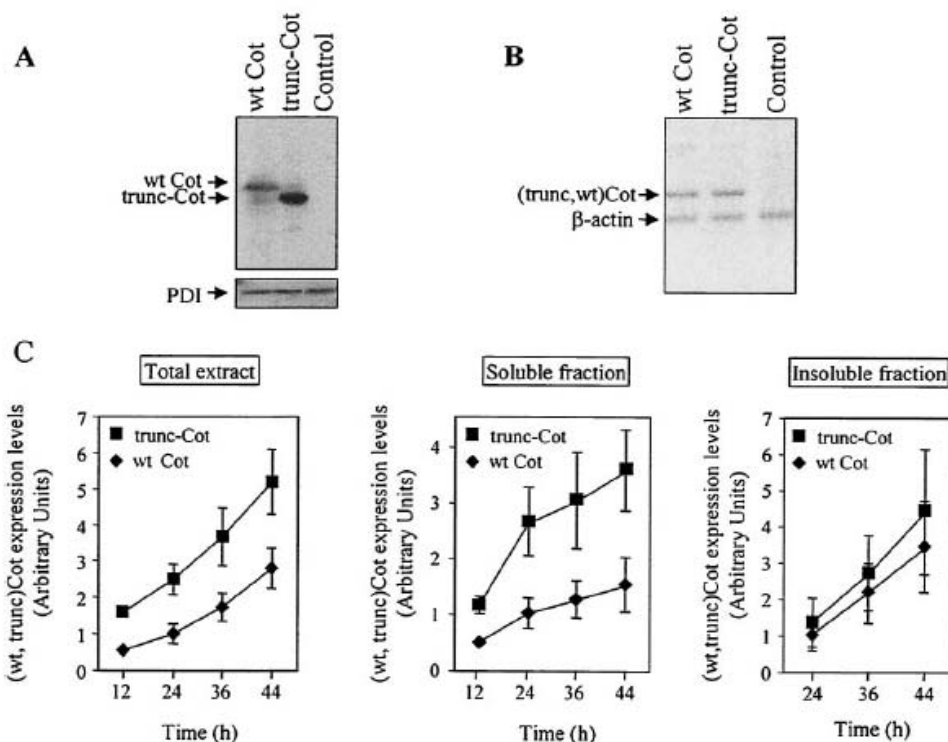


FIG. 1. Expression of wt Cot and trunc-Cot in HEK293 transfected cells. (A and B) Cells were transfected with pcNEO HA-wt Cot (10 μ g), pcNEO HA-trunc-Cot (10 μ g), or pcNEO HA (10 μ g), and 24 h after transfection wt Cot and trunc-Cot protein and mRNA levels were analyzed. wt Cot and trunc-Cot protein levels were determined by Western blot analysis using the anti-Cot monoclonal antibody (Calbiochem) (A). The same PVDF membrane was probed with an anti-PDI antibody as a control of protein loading. The data shown correspond to 30 PCR cycles, and the amount of product amplified (62 to 373 nucleotides [nt] of HA-wt-Cot, 62 to 373 nt of HA-trunc-Cot, and 1,292 to 1,479 nt of β -actin) was proportional to the abundance of the starting material (B). (C) Quantification of the expression of wt Cot and trunc-Cot in total extracts at different times after transfection (12, 24, 36, and 44 h), as well as in soluble and insoluble 1% NP-40 fractions of HEK293 cells transfected with pcNEO HA-wt Cot (10 μ g) or pcNEO HA-trunc-Cot (10 μ g). wt Cot and trunc-Cot were detected by Western blot analysis with anti-Cot antibodies either generated in the laboratory (6) or commercially available (Calbiochem). As a control of protein loading, membranes were also probed with an anti-PDI antibody. The pixel intensities of the different wt Cot and trunc-Cot bands were quantified with GelDoc 200 (Bio-Rad) and corrected to the pixel intensity of PDI. The graphs show the mean \pm standard deviation of the intensities of the different wt Cot and trunc Cot bands from three different experiments, assuming a value of 1 for the intensity obtained for wt Cot 24 h after transfection. \blacklozenge , wt Cot; \blacksquare , trunc-Cot.

min). As a result, it became clear that both wt Cot and trunc-Cot are short-lived proteins (Fig. 2), although the estimated $t_{1/2}$ values calculated for wt Cot and trunc-Cot were consistently and significantly different. The $t_{1/2}$ for wt Cot was 35 min while that for trunc-Cot was 95 min, indicating that wt Cot is more rapidly degraded than trunc-Cot.

trunc-Cot and wt Cot are degraded by the proteasome *in situ* and *in vitro*. Having observed a difference in the degradation of both Cot proteins, we studied the pathways involved in their degradation. After transfection (14.5 h later) of HEK293 cells with pcNEO HA-wt Cot or pcNEO HA-trunc-Cot, the cells were treated with different protease inhibitors for 7.5 h. The protease inhibitors examined included cysteine and a papain proteases inhibitor, such as E64; serine protease inhibitor, such as pepabloc AEBSF; metalloprotease inhibitors, such as phosphoramidon; an inhibitor of tripeptidyl peptidase, such

as Z-AAF-CMK; proteasome inhibitors, such as MG132 or lactacystin; and a calpain inhibitor, such as LLMet, as indicated in Materials and Methods. Total cell extracts were subjected to Western blot analysis, and the steady-state levels of both wt Cot and trunc-Cot proteins in the presence and absence of the inhibitors were determined. A significant increase in the amount of both wt Cot and trunc-Cot protein with respect to untreated control cells was only observed after treatment with the proteasome inhibitor 20 μ M MG132 (Fig. 3A). Incubation of wt Cot- and trunc-Cot-transfected cells with 10 μ M lactacystin (or 20 μ M MG132 [data not shown]) resulted in the accumulation of both proteins not only in the 1% NP-40-soluble fraction but also in the insoluble fraction (Fig. 3B).

The accumulation of both proteins after proteasome inhibitor treatment did not result in the appearance of high-molecular-weight species of trunc-Cot or wt Cot, which would sug-

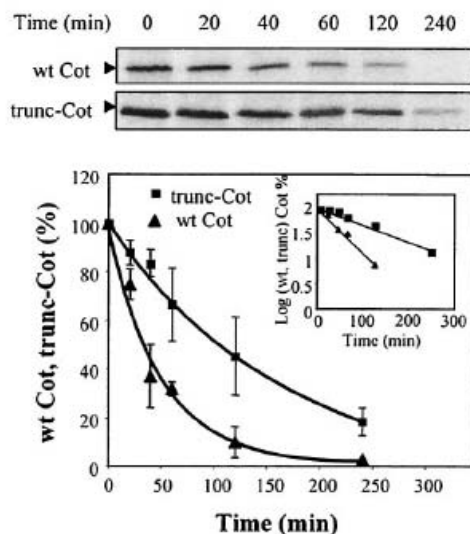


FIG. 2. Degradation of wt Cot and trunc-Cot in HEK293 transfected cells. Immunoprecipitation of ^{35}S -labeled wt Cot and trunc-Cot from HEK293 cells transfected with 10 μg of pcINEO HA-wt Cot or 10 μg of pcINEO HA-trunc-Cot after a 20-min pulse-label and a chase for the times indicated (20, 40, 60, 120, and 240 min). The proteins immunoprecipitated were resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. The radioactivity incorporated was quantified using an Instant Imager. The figure shows one experiment, and the graph shows the mean \pm standard deviation of the radioactivity incorporated in four experiments. The radioactivity incorporated into wt Cot or trunc-Cot after the 20-min pulse was considered 100%. The degradation of both proteins correlated with one-phase exponential equations fit to each data set, with $R^2 = 0.975$ for wt Cot and $R^2 = 0.9736$ for trunc-Cot. The graph also shows a representation of the decay as a log plot. \blacktriangle , wt Cot; \blacksquare , trunc-Cot.

gest the existence of polyubiquitylated forms of Cot. However, this was further examined by enhancing the possible formation of trunc-Cot or wt Cot polyubiquitylated forms. Thus, the cells were cotransfected with wt Cot or trunc-Cot plasmids together with pCMV-His-ubiquitin, and 14.5 h after transfection the cells were incubated for another 7.5 h in the presence or absence of proteasome inhibitors. Under these conditions, we were still unable to detect higher-molecular-weight forms of wt Cot or trunc-Cot in total cell extracts, even in the presence of 20 μM MG132 (data not shown) or 10 μM lactacystin (Fig. 3C). However, when an antiubiquitin antibody was used instead of the anti-Cot antibody, high-molecular-weight polyubiquitylated proteins did appear to accumulate in the same extracts in the presence of 10 μM lactacystin (Fig. 3C). In an attempt to enrich the fraction with wt Cot and trunc-Cot, both proteins were immunoprecipitated from 1 mg of protein extracted from the same cells transfected. However, in Western blotting with the antiubiquitin or anti-Cot antibody even in the presence of 10 μM lactacystin, no polyubiquitylated forms of wt Cot or trunc-Cot could be detected (Fig. 3C). On the other hand, neither wt Cot nor trunc-Cot could be detected by Western blot analysis with anti-Cot antibody in the enriched His-

ubiquitin fraction obtained by affinity chromatography on Ni^{2+} columns (data not shown). Nevertheless, it does appear that the newly synthesized wt Cot and trunc-Cot are also catabolized via the proteasome, since in pulse-chase experiments of HEK293 cells transfected 12 h earlier with pcINEO HA-wt Cot or pcINEO HA-trunc-Cot and incubated or not with 10 μM lactacystin, the proteasome inhibitor clearly prevented the degradation of both newly synthesized trunc-Cot and wt Cot (Fig. 3D).

To further address the role of the proteasome in wt Cot and trunc-Cot stability, degradation experiments were conducted with in vitro-transcribed and -translated wt Cot and trunc-Cot together with 20S proteasome purified from rat liver (4, 5). In this assay, about 55% of wt Cot was degraded 30 min after incubating with the 20S proteasome, while only 20% of trunc-Cot was degraded in this time (Fig. 4A). No degradation was observed in the absence of the proteasome, and degradation was completely prevented by the addition of 10 μM lactacystin (Fig. 4A). All these data indicate that both wt Cot and trunc-Cot are targets for proteasome degradation, both in situ as well as in vitro, and that wt Cot is more sensitive to degradation than trunc-Cot.

The amino acid 435 to 457 region within the C terminal of wt Cot targets the protein to proteasome degradation. The shorter half-life of wt Cot compared to trunc-Cot may be due to the main structural difference between the two proteins, which resides in the C terminal (12, 42). Thus, the C-terminal domain of wt Cot may contain a strong signal that targets the protein for degradation by the proteasome. To test this hypothesis, we transferred the wt Cot C terminal (amino acids 390 to 467) to the C terminus of EYFP, a fusion construct we named pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇. Fluorescence-activated cell sorter analysis was performed 20 h after transfection of HEK293 cells with pEYFP or with pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇. Both pools of transfected cells had a similar percentage of fluorescent cells (about 50%), but the mean fluorescence was systematically lower in cells expressing EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ than in EYFP-transfected cells (data not shown).

To study the degradation of both proteins, HEK293 cells were transfected with either pEYFP, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇, or both plasmids together. After transfection (14.5 h later), cells were incubated with cycloheximide (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for different time periods and the protein accumulated in the total cell extracts was examined using an anti-EYFP antibody in Western blotting. The expression of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ was lower than that of EYFP even before the addition of cycloheximide (Fig. 5A) and, in agreement with the $t_{1/2}$ of >24 h previously reported for EYFP (16), the amount of EYFP did not change significantly over time in the presence of cycloheximide (Fig. 5A). However, in sharp contrast to the stability exhibited by EYFP, the amount of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ declined steadily after the addition of cycloheximide, indicating that the fusion of the C-terminal domain of wt Cot to EYFP conferred instability to the protein (Fig. 5A).

Further experiments were performed on HEK293 cells 14.5 h after cotransfection of pEYFP or pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ together with pCMV-His-ubiquitin; the cells were incubated for a further 7.5 h in the presence or absence of 10 μM lactacystin. As a consequence of inhibiting the proteasome, EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ but not EYFP accumulated in these cells

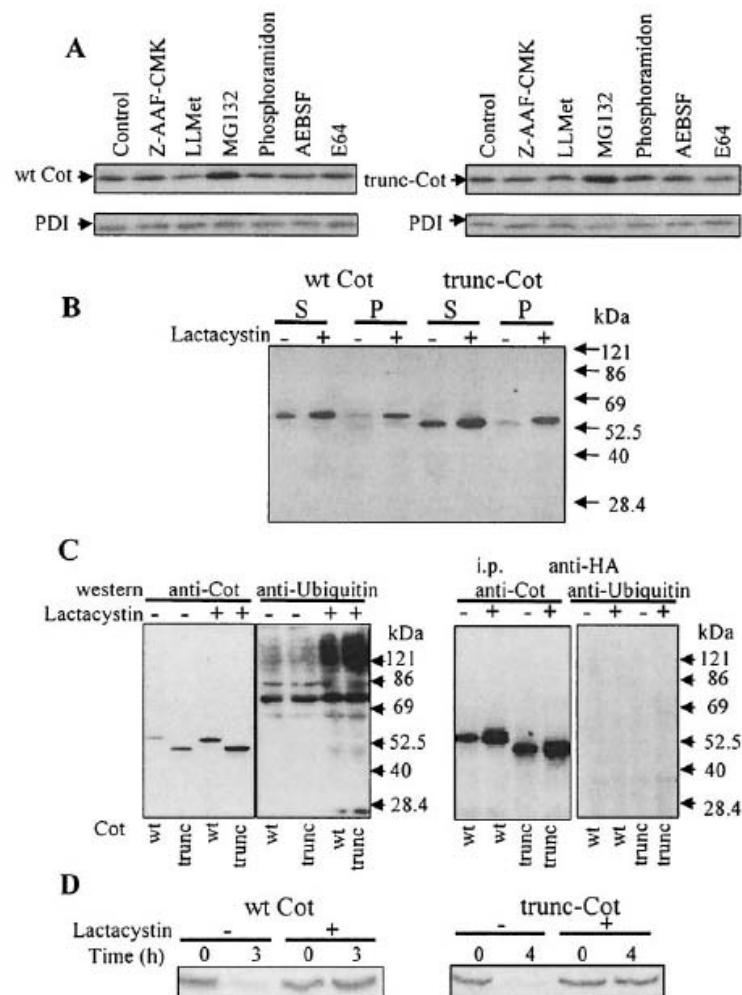


FIG. 3. Levels of wt Cot and trunc-Cot expression after treatment of HEK293 transfected cells with different protease inhibitors. (A) Total extracts of HEK293 cells 14.5 h after transfection with 10 μ g of pcDNA3.1 HA-wt Cot or 10 μ g of pcDNA3.1 HA-trunc-Cot were further incubated for 7.5 h in the presence of different protease inhibitors (10 μ M Z-AAF-CMK, a tripeptidyl peptidase inhibitor; 20 μ M LLMet, a calpain II inhibitor; 20 μ M MG132, a proteasome inhibitor; 20 μ M phosphoramidon, a metalloprotease inhibitor; 1 mM prefabloc AEBSEF, a serine protease inhibitor; or 20 μ M E64, a cysteine protease inhibitor) as indicated in Materials and Methods. Total extracts were analyzed by Western blotting using anti-Cot (Calbiochem) and anti-PDI antibodies. The figure shows representative results of one of the three experiments performed. (B) Cells transfected as indicated for panel A and incubated in the presence or absence of 10 μ M lactacystin were lysed in lysis buffer, and both the 1% NP-40-soluble and -insoluble fractions were analyzed by Western blotting with an anti-Cot antibody (Calbiochem). (C) Total extracts of cells 14.5 h after transfection with 5 μ g of pcDNA3.1 HA-wt Cot or 5 μ g of pcDNA3.1 HA-trunc-Cot together with 5 μ g of pcDNA3.1 His-ubiquitin, which were further incubated for 7.5 h in the presence or absence of 10 μ M lactacystin, were analyzed by Western blotting with anti-Cot antibody (Calbiochem) or with antiubiquitin antibody. Both wt Cot and trunc-Cot were immunoprecipitated from the same transfected cells and analyzed by Western blotting with antiubiquitin antibody and anti-Cot antibody. The figure shows representative results of one of the three experiments performed. (D) Accumulation of newly synthesized wt Cot and trunc-Cot after lactacystin (10 μ M) incubation. 35 S-labeled wt Cot and trunc-Cot were immunoprecipitated from HEK293 cells transfected with 10 μ g of pcDNA3.1 HA-wt Cot or 10 μ g of pcDNA3.1 HA-trunc-Cot after a 20-min pulse and 3-h chase (wt Cot) or 4-h chase (trunc-Cot) in the presence or absence of 10 μ M lactacystin. The proteins were resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. The figure shows representative results of one of the three experiments performed.

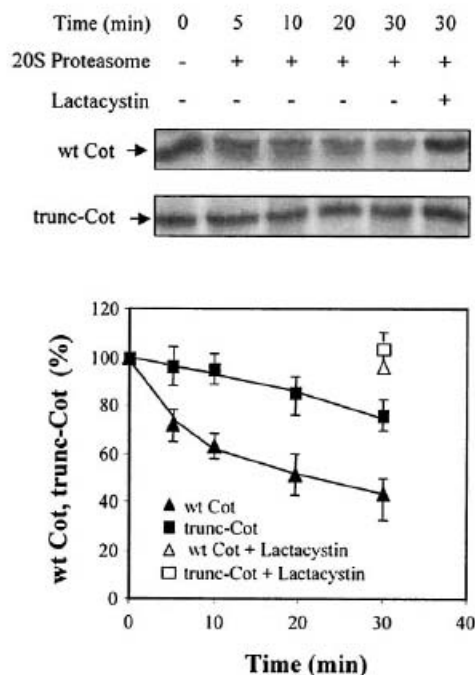


FIG. 4. Degradation of wt Cot and trunc-Cot by the 20S proteasome. Transcribed and translated wt Cot and trunc-Cot were incubated for the indicated times with 20S proteasome in the presence or absence of 10 μ M lactacystin. The proteins were then resolved by SDS-PAGE and visualized by autoradiography, and the incorporated radioactivity was quantified by using an Instant Imager. The figure shows one representative experiment, and the graph shows the mean \pm standard deviation of two experiments performed in duplicate.

(Fig. 5B). Thus, we examined whether the C terminal of wt Cot could also target a protein for degradation by the 20S proteasome in vitro. To this end, we fused the C terminal of wt Cot to the C terminus of GST, and the recombinant GST-Cot₃₉₀₋₄₆₇ protein was analyzed in the in vitro degradation assay. The GST-Cot₃₉₀₋₄₆₇ fusion protein was susceptible to degradation by the 20S proteasome and, as expected, 20 μ M MG132 or 10 μ M lactacystin prevented this degradation (Fig. 5C). In control experiments carried out with recombinant GST, the 20S proteasome was unable to degrade GST (Fig. 5C).

It has recently been reported that protein kinase B (PKB) regulates Cot-induced NF- κ B activation by phosphorylating two residues in the C terminal of wt Cot (31). We therefore investigated whether PKB activity could modulate the sensitivity of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ to proteasome degradation in intact cells by cotransfecting HEK293 cells with pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ and a plasmid that expresses a constitutively active form of PKB, HA-PKB-DD (19). When the protein expression levels of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ were determined after treatment of the transfected cells with cycloheximide (100 μ g/ml), in the presence or absence of lactacystin (10 μ M), it was evident that the constitutively active form of PKB did not affect the steady-state

expression of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ in intact cells or its susceptibility to proteasome degradation (Fig. 6A). To discard the possibility that the endogenous PI3K-PKB signaling pathway was already activated in the transfected cells, 2 h after transfection with EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ the cells were incubated with an inhibitor of PI3K, LY 294002 (50 μ M), and then for 8 h before the lysis with cycloheximide (100 μ M) and LY 294002 (50 μ M) in the presence or absence of lactacystin (10 μ M). The presence of the PI3K inhibitor did not alter the steady-state expression levels of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ or its susceptibility to degradation via the proteasome (Fig. 6B). Similar results were obtained when EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ was cotransfected with a construct that expresses a constitutive dominant-negative form of PKB (PKB-CaaX; data not shown).

To further define the region within the wt Cot C-terminal domain implicated in targeting the EYFP fusion protein for proteasome degradation, different pEYFP-Cot_{390-n} constructs were analyzed, namely, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₅₇, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₄₆, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₃₅, and pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₂₄. When transfected into HEK293 cells and incubated 14.5 h after transfection for 8 h with 100 μ g of cycloheximide/ml in the presence or absence of 10 μ M lactacystin, EYFP-Cot₃₉₀₋₄₅₇ presented similar levels of expression as EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇. Both proteins were hardly detectable in Western blotting after exposure for 8 h to cycloheximide (100 μ g/ml); nevertheless, the presence of lactacystin (10 μ M) inhibited their degradation (Fig. 6C). However, when a further 11 amino acids were deleted from the C terminal of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₅₇, the resulting protein, EYFP-Cot₃₉₀₋₄₄₆, exhibited significantly higher steady-state levels of protein expression than those observed for EYFP-Cot₃₉₀₋₄₅₇ or EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇. Moreover, treatment with cycloheximide (8 h) did not diminish its level of expression (Fig. 6C). Furthermore, EYFP-Cot₃₉₀₋₄₃₅ and EYFP-Cot₃₉₀₋₄₂₄ were expressed at steady-state protein levels similar to those of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₄₆ (Fig. 6C) and EYFP (data not shown).

Having defined what appears to be the C-terminal limit of the sequence in wt Cot that targets it for proteasome degradation, we set out to define the more-N terminal by using a similar strategy. The generated constructs pEYFP-Cot₄₁₄₋₄₅₇, pEYFP-Cot₄₂₆₋₄₅₇, pEYFP-Cot₄₃₅₋₄₅₇, and pEYFP-Cot₄₄₅₋₄₅₇ were transfected into HEK293 cells, and the transfected cells were treated as described above. The EYFP-Cot₄₄₅₋₄₅₇ fusion protein was not susceptible to degradation via proteasome, indicating that although this 12-amino-acid region of the wt Cot C-terminal domain (amino acids 445 to 457) does contain part of the signal necessary for degradation (Fig. 6C), it is not sufficient to target the fusion protein to proteasome degradation (Fig. 6D). However, the fusion of the amino acid 435 to 457 region within the wt Cot C-terminal domain to EYFP did efficiently target the protein for degradation via proteasome (Fig. 6D).

trunc-Cot exhibits higher specific kinase activity than wt Cot. We also wanted to know whether the increased levels of protein expression of trunc-Cot were correlated with an increased activation of the different signal transduction pathways regulated by Cot. Cot up-regulates the classical MAP kinase pathway (20, 53). Therefore, we analyzed the phosphorylation state of endogenous Erk-1 and Erk-2 in total extracts of HEK293 cells 20 h after transfection with pcINEO HA-wt Cot and pcINEO HA-trunc-Cot. Both wt Cot and trunc-Cot acti-

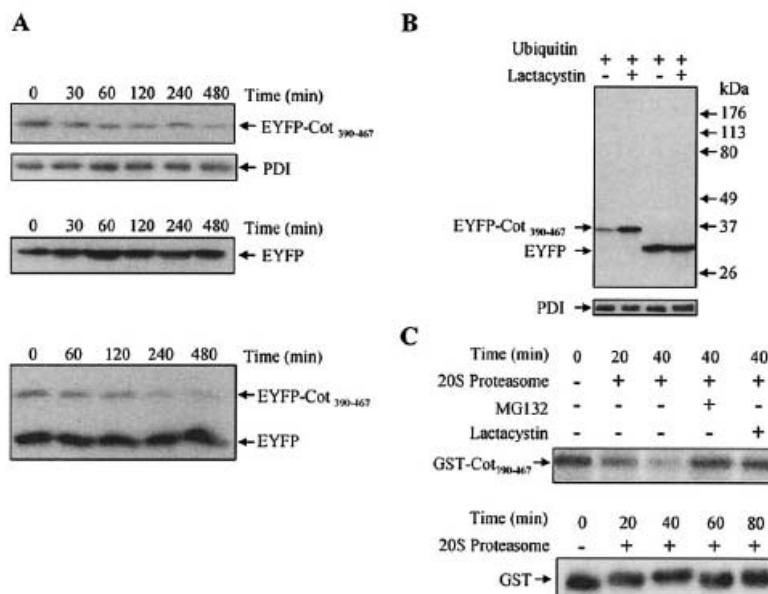


FIG. 5. The C terminal of wt Cot triggers its degradation by the proteasome. (A) HEK293 cells 14.5 h after transfection with 10 μ g of pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ or 10 μ g of pEYFP or cotransfected with 5 μ g of pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ together with 5 μ g of pEYFP were further incubated with 100 μ g of cycloheximide/ml for different times (0, 30, 60, 120, 240, and 480 min). The total extracts were Western blotted and probed with the anti-EYFP antibody. The figure shows one of two experiments performed in duplicate. (B) Total extracts of cells 14.5 h after transfection with 5 μ g of pEYFP or 5 μ g of pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ together with 5 μ g of pCMV-His-ubiquitin and further incubated for 7.5 h in the presence or absence of 10 μ M lactacystin. The extracts were Western blotted and probed with anti-EYFP. Similar results were obtained in two different experiments performed in duplicate. (C) Recombinant GST-Cot₃₉₀₋₄₆₇ was subjected to in vitro degradation by the 20S proteasome for 20 and 40 min. GST-Cot₃₉₀₋₄₆₇ was also incubated with 20S proteasome in the presence of 20 μ M MG132 or 10 μ M lactacystin. The different samples were resolved by SDS-PAGE and Western blotted to be probed with an anti-C-terminal Cot antibody. Similar results were obtained in three experiments performed in duplicate. Recombinant GST was subjected to in vitro degradation for 20, 40, 60, and 80 min by the 20S proteasome. The different samples were resolved by SDS-PAGE followed by Western blotting, which was probed with anti-GST antibody. Similar results were obtained in two experiments performed in duplicate.

vated endogenous Erk-1 and Erk-2, although a higher degree of activation was observed upon transfection of trunc-Cot (Fig. 7A).

It has previously been shown that Cot activity up-regulates the transcription factor AP-1 (7, 13). A reporter construct has been generated that contains the -73-bp collagenase promoter linked to the luciferase reporter gene (-73 pcol-Luc); this promoter region contains only the AP-1 response element and has been extensively used to study AP-1 activation (references 7 and 13 and references therein). Different amounts of pEF-BOS wt Cot, pEF-BOS trunc-Cot, and pEF-BOS were cotransfected together with the -73 pcol-Luc, and Luc activity was measured 20 h after transfection. Cells transfected with trunc-Cot up-regulated AP-1 transcription factor activity to a greater extent than cells expressing wt Cot (Fig. 7B). Interestingly, about 10-fold more wt Cot plasmid than trunc-Cot plasmid was required to reach similar activation levels of the AP-1 responsive element (Fig. 7B).

It has been proposed that the ability of Cot to induce cellular transformation (12, 13) depends on its ability to activate the AP-1 transcription factor (13). We therefore assessed whether the augmented activation of the AP-1 responsive element by

trunc-Cot was correlated with a greater degree of cellular transformation. The transfection of pcINEO HA-wt Cot into NIH 3T3 cells induced the appearance of transformed foci after 2 weeks in culture as previously reported (Fig. 7C) (12, 13). However, the number of transformed foci was clearly higher in NIH 3T3 cells transfected with pcINEO HA-trunc-Cot (Fig. 7C). We then decided to measure the activity of Cot as MAP kinase kinase kinase 1 (MKKK1) in extracts prepared from cells transfected with wt Cot and trunc-Cot. From equal quantities (10 μ g) of the 1% NP-40-soluble fractions of cells transfected with pcINEO HA-Cot wt, pcINEO HA-trunc-Cot (20 h after transfection), wt Cot, and trunc-Cot were immunoprecipitated and Cot activity was determined. The Cot activity (in milliunits per milligram of total protein extract) from trunc-Cot-transfected cells was 10-fold higher (± 1) than that derived from wt Cot-transfected cells (Fig. 7D). These results are qualitatively not unexpected since, as mentioned above, trunc-Cot has higher protein expression levels than wt Cot. However, quantification of the amount of Cot protein that was immunoprecipitated showed an approximately 2.6-fold difference in the protein content in immunoprecipitates from trunc-Cot- and wt Cot-transfected extracts. This quantification allowed us

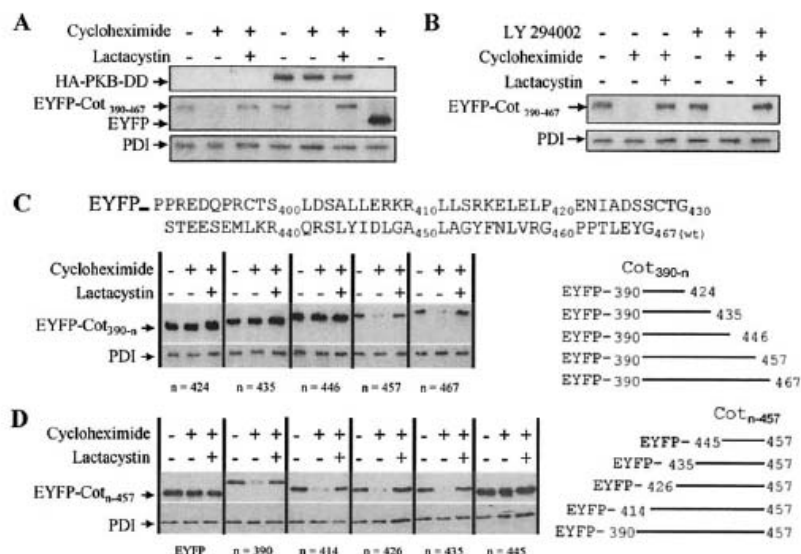


FIG. 6. The amino acid 435 to 457 region within the C terminal of wt Cot confers susceptibility to proteasome degradation and is independent of PKB activity. (A) HEK293 cells were cotransfected with 5 μ g of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇ together with 15 μ g of HA-PKB-DD or empty vector, and 14.5 h after transfection the cells were further incubated with 100 μ g of cycloheximide/ml in the presence or absence of 10 μ M lactacystin as described in Materials and Methods. The figure is representative of the three experiments performed. (B) Two hours after the transfection of HEK293 cells with 10 μ g of EYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇, the cells were incubated with 50 μ M LY 294002 and the medium was then supplemented with 100 μ g of cycloheximide/ml and 50 μ M LY 294002, with and without 10 μ M lactacystin, for a further 8 h. The figure shows representative results of the three experiments performed. (C) HEK293 cells were transfected with 10 μ g of pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₆₇, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₅₇, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₄₆, pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₃₅, or pEYFP-Cot₃₉₀₋₄₂₄, and after 14.5 h cells were treated as described in the legend for Fig. 5B. Total extracts were Western blotted and probed with anti-EYFP and anti-PDI antibodies; the figure shows representative results of one of the three experiments. (D) HEK293 cells transfected for 14.5 h with pEYFP-Cot₄₁₄₋₄₅₇, pEYFP-Cot₄₂₆₋₄₅₇, pEYFP-Cot₄₃₅₋₄₅₇, and pEYFP-Cot₄₄₅₋₄₅₀ were treated as explained above for panel C. The figure shows one of the two experiments performed in duplicate.

to estimate the specific activity (in milliunits per amount of Cot protein) of both trunc-Cot and wt Cot. As a result, it appeared that trunc-Cot exhibited 3.8-fold (± 0.4) higher kinase specific activity than wt Cot (Fig. 7D). A similar difference in the specific activity was also observed between trunc-Cot and wt Cot in autophosphorylation assays (data not shown).

Identification of the region within the C-terminal domain of Cot responsible for the inhibition of wt Cot activity. Finally, we set out to determine the region within the C-terminal domain of wt Cot that inhibits Cot specific activity, as well as to discard the possibility that the 18 amino acids inserted in trunc-Cot were responsible for its higher activity. For this purpose, we generated different wt Cot constructs with increasing portions of the C-terminal domain deleted, namely: pcINEO HA-Cot₄₂₄, pcINEO HA-Cot₄₃₅, pcINEO HA-Cot₄₄₆, and pcINEO HA-Cot₄₅₇. Each of these constructs, as well as pcINEO HA-wt Cot₍₄₆₇₎ and pcINEO HA-trunc-Cot, were cotransfected together with -73 pcol-Luc in HEK293 cells, and Luc activity was measured 20 h after transfection. While Cot₄₂₄ activated the AP-1 response element to the same extent as trunc-Cot (Fig. 8A), the activation produced by the Cot₄₃₅, Cot₄₄₆, and Cot₄₅₇ proteins decreased in a stepwise fashion, with Cot₄₅₇ activating the reporter to the same extent as wt Cot₍₄₆₇₎. We next decided to determine the specific activity of

the different Cot deletion mutants. The different Cot constructs were transfected in HEK293 cells, and Western immunoblot analysis of the steady-state expression levels as well as the Cot activity of the different Cot proteins were determined. In agreement with the data obtained above (Fig. 6C), trunc-Cot, Cot₄₂₄, Cot₄₃₅, and Cot₄₄₆ exhibited expression levels approximately 2.6-fold higher than those of Cot₄₅₇ and wt Cot₍₄₆₇₎ (Fig. 8B). The specific activity of the Cot₄₅₇ protein was similar to that of wt Cot₍₄₆₇₎, and further deletions within the wt Cot C-terminal region produced a gradual increase in the specific activity of Cot mutants, with Cot₄₂₄ demonstrating a similar specific activity as trunc-Cot (Fig. 8B). It is noteworthy that Cot₄₄₆, with a transformation activity between that of wt Cot and trunc-Cot (data not shown), exhibited only 1.5-fold-higher Cot activity per mg of total protein extract than wt Cot; however its 2.6-fold-higher steady-state protein expression compared to wt Cot provided it about 4.6-fold-higher specific activity compared to wt Cot₍₄₆₇₎.

DISCUSSION

Cot/tpl-2 has been implicated in cellular activation and cellular transformation. Thus, Cot/tpl-2 (25, 53), together with c-Raf (18, 30, 37) and c-Mos (43, 51, 57), are three proto-

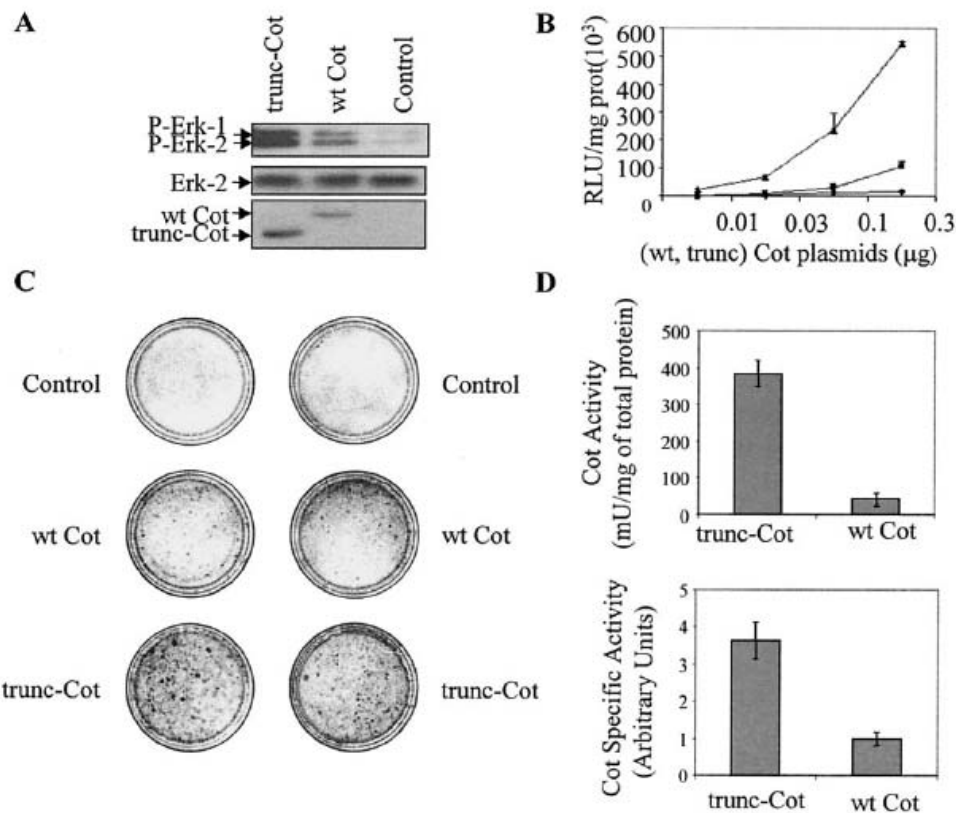


FIG. 7. tronc-Cot exhibits a higher transformation capacity and kinase activity than wt Cot. (A) Western blots of P-Erk in total extracts of HEK293 cells 20 h after transfecting with pcNEO HA-wt Cot (10 μ g), pcNEO HA-tronc-Cot (10 μ g), or pcNEO HA (10 μ g). As a control of protein loaded, total Erk-2 levels were tested. The expression of wt Cot and tronc-Cot was also determined with the anti-Cot antibody (Calbiochem). Similar results were obtained in three different experiments. (B) Different amounts of pEF-BOS wt Cot, pEF-BOS tronc-Cot, or pEF-BOS (0.01, 0.03, 0.1, or 0.3 μ g) together with 0.15 μ g of -73 pco-Luc were cotransfected in HEK293 cells, and Luc activity was measured 20 h after transfection. The graph shows the means \pm standard deviations of three different experiments performed in duplicate. (C) NIH 3T3 cells were transfected with 10 μ g of pcNEO HA-wt Cot, pcNEO HA-tronc-Cot, or pcNEO HA. Cells were cultured for 2 weeks with 10% filtered calf serum, fixed, and then stained as described in Materials and Methods. The figure shows a representative experiment of the three performed. (D) Cot activity per milligram of protein extract and Cot specific activity of wt Cot and tronc-Cot immunoprecipitated from HEK293 cells transfected as described for panel A. Cot activity indicates the milliunits of Cot kinase activity corresponding to 1 mg of transfected extract, with 1 U being 1 nmol of phosphate incorporated into myelin basic protein in 1 min. The specific activity indicates the milliunits of Cot kinase activity divided by the pixel intensity obtained from the scanned Western blots of the immunoprecipitated wt Cot or tronc-Cot, with a value of 1 being attributed to the specific activity of wt Cot divided by the pixel intensity of immunoprecipitated wt Cot. The graphs show the means \pm standard deviations of three different experiments performed in triplicate.

oncogenes that code for MAP kinase kinase kinases that up-regulate the Erk-1/Erk-2 signal transduction pathway. However, different modifications convert these proto-oncogenes into oncogenes. The protein products of both the *v-mil* oncogene and the transforming variants of Raf differ from their proto-oncogenes in their N-terminal regions (10, 26, 48, 49). In contrast, the *c-mos* proto-oncogene and the *v-mos* oncogene differ as a consequence of a proviral insertion in the 5' non-coding region that does not affect the sequence of the protein product (although some viral strains do also have point muta-

tions within their coding sequence) (9, 69). The rearrangement of the 3' region of the human Cot gene, as well as of its murine homologue *tpl-2*, unmasks their transformation activities, both oncogenes encoding C-terminal-truncated and -modified proteins (2, 11, 12, 42, 46). In this paper we demonstrate that the truncation of the C-terminal domain of wt Cot produces an increase in the total kinase activity of Cot through two different mechanisms: by an increase in the $t_{1/2}$ of the protein and by augmenting the specific activity of the kinase. These two independent mechanisms potentiate one another to produce a 10-

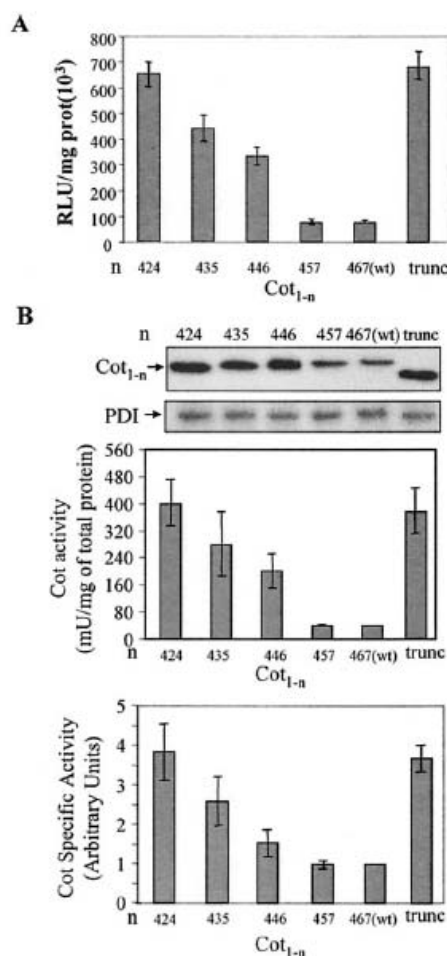


FIG. 8. Identification of the region within the C-terminal domain of wt Cot that inhibits Cot specific activity. (A) HEK293 cells were cotransfected with 0.15 μ g of pcINEO HA-wt Cot₍₄₆₇₎, pcINEO HA-Cot₍₄₅₇₎, pcINEO HA-Cot₍₄₄₆₎, pcINEO HA-Cot₍₄₃₅₎, pcINEO HA-Cot₍₄₂₄₎, or pcINEO HA-trunc-Cot together with 0.15 μ g of -73 pcol-Luc, and Luc activity was measured 20 h after transfection. The graph shows the means \pm standard deviations of two different experiments performed in duplicate. (B) HEK293 cells were transfected with 10 μ g of pcINEO HA-wt Cot₍₄₆₇₎, pcINEO HA-Cot₍₄₅₇₎, pcINEO HA-Cot₍₄₄₆₎, pcINEO HA-Cot₍₄₃₅₎, or pcINEO HA-Cot₍₄₂₄₎. Western blotting of the total extracts of HEK293 cells 20 h after transfection with the different pcINEO Cot constructs was performed as described in the legend for Fig. 1A. The figure shows one representative result of the three experiments performed. As a control of protein loaded, total PDI levels were also assessed. Cot activity and Cot specific activity of the different Cot constructs [wt Cot₍₄₆₇₎, Cot₍₄₅₇₎, Cot₍₄₄₆₎, Cot₍₄₃₅₎, and Cot₍₄₂₄₎] were determined as described in the legend for Fig. 7D. The graphs also show the means of three experiments \pm standard deviations.

fold increase in the kinase activity of Cot. As a consequence, we observed a higher activation state of different MAP kinase transduction pathways in trunc-Cot-transfected cells, such as the Erk-1/Erk-2 and the Jnk-AP-1 pathways. Abnormal activation of these MAP kinase pathways has previously been associated with cellular transformation (41, 55), and indeed we have also shown that a higher number of transformed foci were generated in NIH 3T3 cells transfected with trunc-Cot than with wt Cot. In agreement with these data, it has been proposed that the ability of wt Cot to induce cellular transformation (12, 13) depends on its capacity to activate the AP-1 transcription factor (13).

The structural difference between wt Cot and trunc-Cot resides in the 69 amino acids of the C-terminal domain that in trunc-Cot are replaced by 18 amino acids of unrelated sequence. Here we show that the deletion of the last 43 C-terminal amino acids of wt Cot renders a protein with a similar activity to that of trunc-Cot. Thus, the domain that represses its kinase activity resides in amino acids 425 to 467 of wt Cot (Fig. 9), excluding the possibility that the 18-amino-acid insertion at the C terminal of trunc-Cot enhances its kinase specific activity. In this context, we also must bear in mind that the C terminals of wt tpl-2 and wt Cot are homologous, whereas the 10-amino-acid insert in trunc-tpl-2, which also behaves as an oncogene, does not share any homology with the 18 amino acids inserted into trunc-Cot (11, 46). Moreover, although the difference in the kinase specific activity between tpl-2 and trunc-tpl-2 is unknown, it has been shown that the C terminal of tpl-2 is capable of inhibiting the kinase activity of trunc-tpl-2 in vitro (11). These data, together with the fact that the Cot mutants with increasing C-terminal deletions exhibited increased specific activities, indicate that the C-terminal domain of wt Cot is an autoinhibitory domain. Therefore, by specifically up-regulating certain extracellular signals, it should be possible to abolish this C-terminal repression of kinase activity, perhaps by inducing posttranslational modifications in the Cot protein. In this context, it should be taken into account that the phosphorylation of the C-terminal domain of wt Cot by PKB (31) appeared to have no effect on the MKKK1 activity of wt Cot (M. Caivano, C. Rodriguez, P. Cohen, and S. Alemany, personal communication) or on AP-1 activation by wt Cot (31).

The C terminal of wt Cot also plays an important role in targeting the protein for degradation, as the amino acids 435 to 457 within the wt Cot C-terminal domain appear to be a region that controls the stability of wt Cot (Fig. 9). In this context, it is noteworthy that the region between amino acids 435 and 446, as well as the region between amino acids 445 and 457, are essential regions, but not sufficient, to target the EYFP C-terminal wt Cot fusion protein for degradation via the proteasome (Fig. 6C and D). This explains the similar levels of expression exhibited by Cot₍₄₄₆₎ and trunc-Cot (Fig. 8A). The recognition-degradation signal contained in the region of amino acids 435 to 457 from wt Cot is capable of conferring instability to other unrelated proteins, an essential quality of the recognition-degradation sequences denominated degron, and we propose that this proteasome recognition sequence accounts for the lower $t_{1/2}$ and the lower steady-state expression levels of wt Cot compared to trunc-Cot. To our knowledge, this region within wt Cot does not share similarities with other previously described degrons. Moreover, our data sug-

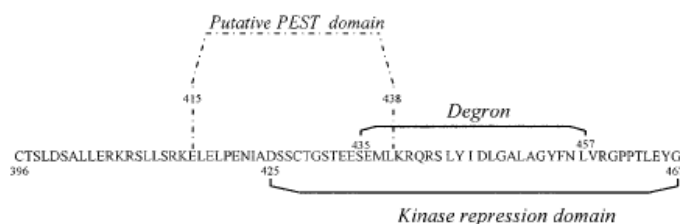


FIG. 9. Representation of the different regions within C-terminal wt Cot. The analysis of the putative PEST sequences was performed with the pestfind program located at <http://www.at.emblnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/>.

gest a direct recognition of the Cot degron by the 20S proteasome. In this context, and considering that the C terminals of both wt Cot and wt *tpl-2* are almost identical, it seems likely that the C terminal of *tpl-2* also confers instability to the protein. Analysis of putative PEST domains (52) within the C terminal of wt Cot revealed that the region between amino acids 415 and 438 is a putative PEST sequence (Fig. 9). However, the degradation experiments performed with the different EYFP-Cot constructs revealed that this sequence does not play any role in the proteasome recognition-degradation of the C terminal of wt Cot.

It is accepted that short-lived proteins are mainly degraded via the proteasome (34, 67), a hypothesis supported by the results presented here for wt Cot and trunc-Cot. However, our data also suggest that both wt Cot and trunc-Cot are catabolized via the proteasome in an ubiquitylation-independent manner. In this context, it should be stressed that although the vast majority of proteins need to be polyubiquitylated prior to proteasome degradation, other proteins that do not need to be polyubiquitylated for proteasome degradation are starting to be identified (3, 15, 36, 39, 50, 60, 66). However, the possibility that an isopeptidase activity could hydrolyze the polyubiquitin chain cannot be excluded.

Interestingly, not only wt Cot but also trunc-Cot is degraded via the proteasome, indicating that wt Cot could contain more than one recognition site for proteasome degradation and that at least one of these is maintained in the trunc-Cot protein sequence. In this context, the region regulating stability has been identified in the N-terminal stability-regulating region of the MAP kinase kinase kinase *c-Mos* (45, 56). However, considering that the wt Cot sequence and the wt *tpl-2* sequence do not contain the amino acids described as essential for the destabilization of *c-mos* at the specific positions (45, 56), it is unlikely that wt Cot or wt *tpl-2* contain this stability-regulating region.

The insertion of MLV or MMTV provirus into the *tpl-2* gene and the truncation of the Cot gene produce the deletion of the 3' untranslated region of the *tpl-2* or Cot gene that harbors three copies of the RNA-destabilizing sequence AUUUA. This results in higher expression levels of the corresponding mRNAs (23, 46). Thus, it has been proposed that this increase in the mRNA levels of the truncated Cot or *tpl-2* gene may lead to higher levels of protein expression and therefore to cell transformation (23, 46, 63). However, we have shown here that trunc-Cot exhibits greater cellular transformation capacity and kinase activity than wt Cot and that trans-

fection of both plasmids renders similar levels of mRNA expression. Thus, we conclude that, as a consequence of the Cot gene truncation, regulation is altered at three different levels: stabilization of the mRNA (23, 46), an increase in the Cot specific activity, and stabilization of the protein. Moreover, as shown here, the increase in the kinase specific activity and the stabilization of the truncated protein induce a 10-fold increase in Cot kinase activity and, consequently, a higher transformation capacity.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dirk Bohmann for providing the pCMV-His-ubiquitin construct, M. F. Balduino Burgering for the HA-PKB-DD and PKB-CaaX constructs, and Blanca Duarte and Nora Perez for their technical help.

This work was supported by CICYT grant SAF 2002-00566 to J.G.C. and BMC2002-00437, AICR, and Fundación La Caixa grants to S.A. M.L.G. was the recipient of a fellowship from the Fundación Marcelino Botín, and P.L. was the recipient of a fellowship from Fundación La Caixa.

REFERENCES

1. Alessi, D. R., P. Cohen, A. Ashworth, S. Cowley, S. J. Leever, and C. J. Marshall. 1995. Assay and expression of mitogen-activated protein kinase, Map kinase kinase, and RAF. *Methods Enzymol.* 255:279-290.
2. Aoki, M., T. Akiyama, J. Miyoshi, and K. Toyoshima. 1991. Identification and characterization of protein products of the cot oncogene with serine kinase activity. *Oncogene* 6:1515-1519.
3. Arribas, J., P. Arizti, and J. G. Castano. 1994. Antibodies against the C2 COOH-terminal region discriminate the active and latent forms of the multicatalytic proteinase complex. *J. Biol. Chem.* 269:12858-12864.
4. Arribas, J., and J. G. Castano. 1993. A comparative study of the chymotrypsin-like activity of the rat liver multicatalytic proteinase and the ClpP from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268:21165-21171.
5. Arribas, J., and J. G. Castano. 1990. Kinetic studies of the differential effect of detergents on the peptidase activities of the multicatalytic proteinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 265:13969-13973.
6. Ballester, A., R. Tobena, C. Lisbona, V. Calvo, and S. Alemany. 1997. Cot kinase regulation of IL-2 production in Jurkat T cells. *J. Immunol.* 159:1613-1618.
7. Ballester, A., A. Velasco, R. Tobena, and S. Alemany. 1998. Cot kinase activates tumor necrosis factor- α gene expression in a cyclosporin A-resistant manner. *J. Biol. Chem.* 273:14099-14106.
8. Belch, M. P., A. Salmeron, L. H. Johnston, and S. C. Ley. 1999. TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF- κ B-inhibitory protein NF- κ B1 p105. *Nature* 397:363-368.
9. Blair, D. G., M. K. Oskarsson, A. Seth, K. J. Dunn, M. Dean, M. Zweig, M. A. Tainsky, and G. F. Vande Woude. 1986. Analysis of the transforming potential of the human homolog of *mos*. *Cell* 46:785-794.
10. Bonner, T. I., H. Oppermann, P. Seeburg, S. B. Kerby, M. A. Gunnell, A. C. Young, and U. R. Rapp. 1986. The complete coding sequence of the human *raf* oncogene and the corresponding structure of the *c-raf-1* gene. *Nucleic Acids Res.* 14:1009-1015.
11. Ceci, J. D., C. P. Patriotis, C. Tsatsanis, A. M. Makris, R. Kovatch, D. A. Swing, N. A. Jenkins, P. N. Tschlis, and N. G. Copeland. 1997. Tpl-2 is an

- oncogenic kinase that is activated by carboxy-terminal truncation. *Genes Dev.* 11:688-700.
12. Chan, A. M., M. Chedid, E. S. McGovern, N. C. Popescu, T. Miki, and S. A. Aaronson. 1993. Expression cDNA cloning of a serine kinase transforming gene. *Oncogene* 8:1329-1333.
 13. Chiariello, M., M. J. Marinissen, and J. S. Gutkind. 2000. Multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways connect the cot oncoprotein to the *c-fos* promoter and to cellular transformation. *Mol. Cell. Biol.* 20:1747-1758.
 14. Ciechanover, A., A. Orian, and A. L. Schwartz. 2000. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22:442-451.
 15. Coffino, P. 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:188-194.
 16. Corish, P., and C. Tyler-Smith. 1999. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* 12:1035-1040.
 17. de Gregorio, R., M. A. Iniguez, M. Fresno, and S. Alemany. 2001. Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J. Biol. Chem.* 276:27003-27009.
 18. Dent, P., W. Haser, T. A. Haystead, L. A. Vincent, T. M. Roberts, and T. W. Sturgill. 1992. Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 257:1404-1407.
 19. Dufner, A., M. Andjelkovic, B. M. Burgering, B. A. Hemmings, and G. Thomas. 1999. Protein kinase B localization and activation differentially affect S6 kinase 1 activity and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 19:4525-4534.
 20. Dumitru, C. D., J. D. Ceci, C. Tsatsanis, D. Kontoyiannis, K. Stamatakis, J. H. Lin, C. Patriotis, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, G. Kollias, and P. N. Tsichlis. 2000. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 103:1071-1083.
 21. Eliopoulos, A. G., C. Davies, S. S. Blake, P. Murray, S. Najafipour, P. N. Tsichlis, and L. S. Young. 2002. The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF- κ B signaling downstream of TRAF2. *J. Virol.* 76:4567-4579.
 22. Eliopoulos, A. G., C. D. Dumitru, C. C. Wang, J. Cho, and P. N. Tsichlis. 2002. Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J.* 21:4831-4840.
 23. Erny, K. M., J. Peli, J. F. Lambert, V. Muller, and H. Diggelmann. 1996. Involvement of the Tpl-2/cot oncogene in MMTV tumorigenesis. *Oncogene* 13:2015-2020.
 24. Glotzer, M., A. W. Murray, and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-138.
 25. Hagemann, D., J. Troppmair, and U. R. Rapp. 1999. Cot proto-oncoprotein activates the dual specificity kinases MEK-1 and SEK-1 and induces differentiation of PC12 cells. *Oncogene* 18:1391-1400.
 26. Heidecker, G., M. Huleihel, J. L. Cleveland, W. Kolch, T. W. Beck, P. Lloyd, T. Pawson, and U. R. Rapp. 1990. Mutational activation of *c-raf-1* and definition of the minimal transforming sequence. *Mol. Cell. Biol.* 10:2503-2512.
 27. Henchoz, S., Y. Chi, B. Catarin, I. Herskowitz, R. J. Deshaies, and M. Peter. 1997. Phosphorylation- and ubiquitin-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor Fhl1p in budding yeast. *Genes Dev.* 11:3046-3060.
 28. Herskko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-479.
 29. Hochstrasser, M., and A. Varshavsky. 1990. In vivo degradation of a transcriptional regulator: the yeast α 2 repressor. *Cell* 61:697-708.
 30. Howe, L. R., S. J. Levers, N. Gomez, S. Nakielnny, P. Cohen, and C. J. Marshall. 1992. Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71:335-342.
 31. Kane, L. P., M. N. Mollenauer, Z. Xu, C. W. Turck, and A. Weiss. 2002. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF- κ B-dependent transcription. *Mol. Cell. Biol.* 22:5962-5974.
 32. King, R. W., R. J. Deshaies, J. M. Peters, and M. W. Kirschner. 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274:1652-1659.
 33. King, R. W., M. Glotzer, and M. W. Kirschner. 1996. Mutagenic analysis of the destruction signal of mitotic cyclins and structural characterization of ubiquitinated intermediates. *Mol. Biol. Cell* 7:1343-1357.
 34. Kornitzer, D., and A. Ciechanover. 2000. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell Physiol.* 182:1-11.
 35. Krappmann, D., F. G. Wulczyn, and C. Scheidereit. 1996. Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF- κ B inhibitor I κ B α in vivo. *EMBO J.* 15:6716-6726.
 36. Kroll, M., M. Conconi, M. J. Desterro, A. Marin, D. Thomas, B. Friguet, R. T. Hay, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and M. S. Rodriguez. 1997. The carboxy-terminus of I κ B α determines susceptibility to degradation by the catalytic core of the proteasome. *Oncogene* 15:1841-1850.
 37. Kyriakis, J. M., H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, and J. Avruch. 1992. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358:417-421.
 38. Lin, X., E. T. Cunningham, Jr., Y. Mu, R. Gelezianus, and W. C. Greene. 1999. The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF- κ B acting through the NF- κ B-inducing kinase and I κ B kinases. *Immunity* 10:271-280.
 39. Lucas, J., D. Lobo, E. Terry, E. L. Hogan, and N. L. Banik. 1992. Susceptibility of myelin proteins to a neutral endoproteinase: the degradation of myelin basic protein (MBP) and P2 protein by purified bovine brain multicatalytic proteinase complex (MPC). *Neurochem. Res.* 17:1261-1266.
 40. Makris, A., C. Patriotis, S. E. Bear, and P. N. Tsichlis. 1993. Genomic organization and expression of Tpl-2 in normal cells and Moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell lymphomas: activation by provirus insertion. *J. Virol.* 67:4283-4289.
 41. Mansour, S. J., W. T. Matten, A. S. Hermann, J. M. Candia, S. Rong, K. Fukasawa, G. F. Vande Woude, and N. G. Ahn. 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265:966-970.
 42. Miyoshi, J., T. Higashi, H. Mukai, T. Ohuchi, and T. Kakunaga. 1991. Structure and transforming potential of the human cot oncogene encoding a putative protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11:4088-4096.
 43. Nebreda, A. R., C. Hill, N. Gomez, P. Cohen, and T. Hunt. 1993. The protein kinase mos activates MAP kinase kinase in vitro and stimulates the MAP kinase pathway in mammalian somatic cells in vivo. *FEBS Lett.* 333:183-187.
 44. Nieto, A., E. Mira, and J. G. Castano. 1990. Transcriptional regulation of rat liver protein disulphide-isomerase gene by insulin and in diabetes. *Biochem. J.* 267:317-323.
 45. Nishizawa, M., N. Furuno, K. Okazaki, H. Tanaka, Y. Ogawa, and N. Sagata. 1993. Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *EMBO J.* 12:4021-4027.
 46. Patriotis, C., A. Makris, S. E. Bear, and P. N. Tsichlis. 1993. Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2251-2255.
 47. Patriotis, C., A. Makris, J. Chernoff, and P. N. Tsichlis. 1994. Tpl-2 acts in concert with Ras and Raf-1 to activate mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9755-9759.
 48. Patschinsky, T., and K. Bister. 1988. Structural analysis of normal and transforming *myb* proteins: effect of 5'-truncation on phosphorylation in vivo or in vitro. *Oncogene* 3:357-364.
 49. Patschinsky, T., H. W. Jansen, H. Blocker, R. Frank, and K. Bister. 1986. Structure and transforming function of transduced mutant alleles of the chicken *c-myc* gene. *J. Virol.* 59:341-353.
 50. Pereira, M. E., T. Nguyen, B. J. Wagner, J. W. Margolis, B. Yu, and S. Wilk. 1992. 3,4-Dichloroisocoumarin-induced activation of the degradation of beta-casein by the bovine pituitary multicatalytic proteinase complex. *J. Biol. Chem.* 267:7949-7955.
 51. Posada, J., N. Yew, N. G. Ahn, G. F. Vande Woude, and J. A. Cooper. 1993. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 13:2546-2553.
 52. Rechsteiner, M., and S. W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21:267-271.
 53. Salmeron, A., T. B. Ahmad, G. W. Carfile, D. Pappin, R. P. Narsimhan, and S. C. Ley. 1996. Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J.* 15:817-826.
 54. Sanchez-Gongora, E., C. Lisbona, R. de Gregorio, A. Ballester, V. Calvo, L. Perez-Jurado, and S. Alemany. 2000. COT kinase proto-oncogene expression in T cells: implication of the JNK/SAPK signal transduction pathway in COT promoter activation. *J. Biol. Chem.* 275:31379-31386.
 55. Schutte, J., J. Viallet, M. Nau, S. Segal, J. Fedorko, and J. Minna. 1989. *jun-B* inhibits and *c-fos* stimulates the transforming and trans-activating activities of *c-jun*. *Cell* 59:987-997.
 56. Sheng, J., A. Kumagai, W. G. Dunphy, and A. Varshavsky. 2002. Dissection of c-MOS degron. *EMBO J.* 21:6061-6071.
 57. Shibuya, E. K., and J. V. Ruderman. 1993. Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells. *Mol. Biol. Cell* 4:781-790.
 58. Sourvinos, G., C. Tsatsanis, and D. A. Spandidos. 1999. Overexpression of the Tpl-2/Cot oncogene in human breast cancer. *Oncogene* 18:4968-4973.
 59. Stancovski, I., H. Gonen, A. Orian, A. L. Schwartz, and A. Ciechanover. 1995. Degradation of the proto-oncogene product c-Fos by the ubiquitin proteolytic system in vivo and in vitro: identification and characterization of the conjugating enzymes. *Mol. Cell. Biol.* 15:7106-7116.
 60. Taviton, R., J. Richardson, S. Bose, M. Nakanishi, J. Rivett, and M. J. Allday. 2001. A degradation signal located in the C-terminus of p21WAF1/CIP1 is a binding site for the C8 alpha-subunit of the 20S proteasome. *EMBO J.* 20:2367-2375.
 61. Treier, M., L. M. Staszewski, and D. Bohmann. 1994. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78:787-798.
 62. Tsatsanis, C., C. Patriotis, S. E. Bear, and P. N. Tsichlis. 1998. The Tpl-2 proto-oncoprotein activates the nuclear factor of activated T cells and induces interleukin 2 expression in T cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3827-3832.

63. Tsatsanis, C., C. Patrioticis, and P. N. Tsichlis. 1998. Tpl-2 induces IL-2 expression in T-cell lines by triggering multiple signaling pathways that activate NFAT and NF- κ B. *Oncogene* 17:2609–2618.
64. Varshavsky, A. 1991. Naming a targeting signal. *Cell* 64:13–15.
65. Velasco-Sampayo, A., and S. Alemany. 2001. p27kip protein levels and E2F activity are targets of Cdk kinase during G₁ phase progression in T cells. *J. Immunol.* 166:6084–6090.
66. Verma, R., and R. J. Deshaies. 2000. A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 101:341–344.
67. Verma, R., H. McDonald, J. R. Yates III, and R. J. Deshaies. 2001. Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell* 8:439–448.
68. Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:1015–1068.
69. Wood, T. G., M. L. McGeady, B. M. Baroudy, D. G. Blair, and G. F. Vande Woude. 1984. Mouse c-myc oncogene activation is prevented by upstream sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7817–7821.

Title

Cot/tpl-2 influences the invasive potential of transformed cells.

Cristina Rodríguez, Pilar López, Maite Pozo, Antonio Martín Duce, Marta Pelaéz,

Margarita Fernández, and Susana Alemany*

IIB-CSIC, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain.

Correspondence to: Susana Alemany, IIB-CSIC, Arturo Duperier 4, 28029 Madrid, Spain.

Phone: 34-91-4975418; Fax: 34-91-5854401; E-mail: salemany@iib.uam.es

Abstract

Cot/tpl-2 was identified in a truncated/modified form as an oncogene (Cot-T). Here we now demonstrate that Cot regulates different steps involved in the process of cell invasion. Overexpression of Cot-T increases cell invasion and migration, and reduces cell adhesion. The influence of Cot-T on cell migration is mediated, at least partially, by the induction of COX2. Cot regulates the activity of metalloproteinase-9 and metalloproteinase-2, the levels of Rho-GTP and Rac-GTP, as well as the reorganization of the cytoskeleton. Immunocytochemistry studies of Cot-T overexpressing cells show loss of stress fibres, polarization of the microtubule cytoskeleton, high number of lamellipodia, and diminished paxillin levels. In contrast, siRNA-mediated endogenous Cot-depleted cells exhibit reduced invasion and migration capacity, increased expression of stress fibres and hardly any Arp2/3 complexes. Inflammatory and invasive processes share common molecular events and accordingly, here we demonstrate that proto-oncogenic Cot is involved in cell invasion in addition to its established role in innate and adaptive immunity. Thereby Cot, a very attractive target for the development of improved anti-inflammatory drugs, could also be a target to block cell invasion.

Key words: Cot/tpl-2, Erk1/Erk2, cell invasion, cell migration, COX2

Introduction

Cot/tpl2 (MAP3K8) is involved in innate and adaptive immunity processes by switching on the MKK1-Erk1/Erk2 pathway in response to the activation of some receptors of the TNF α and TLR super-families [reviewed in (1)]. The human *Cot* gene was identified as an oncogene (2), that leads to the expression of a truncated/modified protein, Cot-T (3). Insertion of MLV or MMTV into the murine *Cot* homologues also induces cell transformation (4, 5). Indeed, HTLV-I-transformed T cells show deregulated activation of Cot (6), modification in *Cot* was confirmed in some human adenocarcinoma tumors (7) and high Cot mRNA levels were found in some human large granular lymphocyte disorders (8) as well as in some human breast cancers (9). Thus, although physiologically Cot mediates immunity processes, mutations in *Cot* lead to cell malignancy.

Here, we demonstrate that non-physiological up-regulation of Cot activity further increases cell invasion by modulating different steps involved in the process, whereas blockage of endogenous Cot expression results in diminished cell invasion.

Materials and Methods

Cell culture transfection and selection. HeLa cells were transfected with the puromycin resistant plasmids: pclx, pclx-Cot-T, pSR, or with a mixture of pSR-368- plus pSR-525-Cot siRNA as described previously (10). Positive transfected cells were selected by adding puromycin (1 µg/ml, Gibco-BRL) to the incubation media for 24 h. As a control, non-transfected cells were also exposed to puromycin.

Western blots and luciferase assays. Western blots were performed at least three times with similar results, with selected cells incubated for 20 h in 0.1% FBS/DMEM and utilizing anti-Cot (Calbiochem or Santa Cruz), anti-p-JNK, anti-p-Erk1/Erk2, anti-Erk2 (Cell Signalling), anti-COX2 (Transduction Laboratories), anti-paxillin (BD), or anti-PDI (3) antibodies. For luciferase assays, cells were transfected with pclx (3.6 µg) or pclx-Cot-T (3.6 µg) together with p3x-Nf-κB-Luc (1.3 µg) and incubated for 24 h before luciferase activity was measured (11).

DIGE and mass spectrometry. Cells were lysed in lysis buffer (30 mM Tris, pH 7.5, 7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS and protease inhibitors) and Cot-T or Cot-siRNAs cell extracts (75 µg) were run together with control cell extracts (75 µg) in a strip (3-11 pH, 24 cm). The proteins were further separated on 12% SDS-Tris-glycine gels and scanned in a Typhoon 9400 scanner (GE-Healthcare). Mass spectrometry analysis was performed using micropreparative gels (500 µg of protein). Spots of interest were identified in a 4700 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems) at the Proteomics Center of UC, Madrid (<http://www.ucm.es/proteomica>).

Invasion, migration, and adhesion assays. Matrigel transmigration assays were performed as described previously (12). Cells were added to the upper side of the inserts and incubated for 24 h. Cells from 10 fields on the lower and on the top surface of the filter were counted under a light microscope. The percentage of invasion was determined as $[\Sigma \text{ cells of the bottom} / \Sigma \text{ total cells}] \times 100$. Wound healing assays were made with cells at confluence in 1% or 3% FBS/DMEM in matrigel-coated plates. Photographs were taken at different times and cell migration was determined as the difference in the wound width (μm) between 0 h and 16 h, utilizing the Act 2U Nikon measurement tool. The inhibitor drugs (Sigma, Tockris) were added 2 h before wounding and maintained throughout the assay. Cell viability (over 95%) was tested after each assay by trypan blue exclusion. To perform adhesion assays, cells incubated for 20 h in DMEM supplemented with 50% conditioned medium (CM, extracellular medium from NIH3T3 cells cultured in serum-free DMEM for 48 h) were labelled with BCECF-AM (Sigma). Cells were added to each well coated with different extracellular matrices (Sigma) and incubated for 45 min. Non adherent cells were removed by PBS washing. Adherent cells were quantified according to manufacturer's instructions.

Measurement of Rho-GTP and Rac-GTP levels. Selected cells, incubated for 20 h in 0.1% FBS/DMEM in the presence or absence of the indicated inhibitors, were PBS washed and solubilized in G-lisa lysis buffer. Fifty micrograms of protein were used to measure Rho A/B/C-GTP or Rac-GTP levels according to manufacturer's instructions (Quantitative Rho A/B/C-GTP and Rac-GTP G-Lisa Kits, Cytoskeleton).

Immunocytochemical studies of cytoskeletal components in HeLa cells. Selected cells, cultured on fibronectin coated glass slides in 10% FBS/DMEM and depleted in 0.1% FBS/DMEM for 16-24 h, were fixed with 2% paraformaldehyde/ H_2O , permeabilized with

0.5% triton/H₂O, and incubated with phalloidin-FITC, or with different primary antibodies followed by ALEXA594 (Molecular Probes) secondary antibody. Photographs were taken at 63x with an Olympus fluorescence microscope coupled to a Nikon digital camera.

Metalloproteinases activity. The extracellular medium from control, Cot-T, or Cot-siRNAs cells cultured for 48 h, were utilized to perform gel zymography assays as described previously (12). The extracellular medium of HT1080 cells was run in parallel as positive control. The metalloproteinase (MMP) activity bands were quantified by densitometric analysis utilizing the Soft Imaging System program.

Statistical studies. Student's T-test was carried out to determine difference between control and Cot-T cells, between control and Cot-siRNAs cells, and between samples with or without drug addition (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Results

Cot regulates cell invasion, cell migration, and cell adhesion. Using siRNA technology we have previously shown that in HeLa cells, Cot is the sole MAP3K regulating the activation of the Erk1/Erk2 kinase cascade in response to IL-1 stimulation (10). Cot-siRNAs HeLa cells clearly exhibited diminished endogenous Cot and p-Erk1/Erk2 levels respect to control cells [previously in shown (10) and (Fig. 1A,D)]. In addition, HeLa cells overexpressing Cot-T showed increased p-Erk1/Erk2 and p-JNK levels (Fig. 1B,D, and (13)), and increased NF- κ B activity (Fig. 1B, and (14)). We next decided to investigate whether changes in Cot activity could modify the proteome of HeLa cells. DIGE proteome analysis between control and Cot-siRNAs cells did not identify any consistent or statistically significant change, but comparison of control and Cot-T cells showed that the expression of one spot was consistently and significantly (5.3-fold) induced in Cot-T cells. Mass spectrometry identified it as COX2 (Fig. 1C). Western blot analysis confirmed that Cot-T cells contained higher COX2 protein levels than control or Cot siRNAs cells (Fig. 1D). The induction of COX-2 by Cot-T was also observed when HeLa cells were incubated in different media (1% or 3% FBS/DMEM, or 50% CM/DMEM) and mRNA array analysis of Cot-T and control cells indicated that COX2 mRNA levels are induced by Cot-T in HeLa cells (data not shown).

A contribution of COX2 in tumour cell invasiveness has been established (15). Thus, to study the possible role of Cot in cell invasiveness, we investigated the behaviour of the different selected cells in a matrigel invasion chamber assay. Systematically, Cot-T cells exhibited a percentage of invasion of 45 \pm 7% and control cells of 31 \pm 2%. Cot-siRNAs cells however exhibited the lowest percentage of invasion with just a 10 \pm 3% (Fig. 2A). MTT assay of Cot-T, control, and Cot-siRNAs cells incubated in 1% or 3% FBS/DMEM, or 50% CM/DMEM did not reveal any significant difference in the cell number (data not shown), excluding the

possibility that the increased invasion capacity of Cot-T cells was due to an increase in their proliferation rate.

Since migration is a key step in cell invasion and to determine whether Cot influences cell migration, we carried out wound healing assays on cells in 1% or 3% FBS/DMEM. Overexpression of Cot-T augmented cell migration, with a rate of $58 \pm 7\%$ in 3% FBS/DMEM and of $63 \pm 19\%$ in 1% FBS/DMEM, while control cells displayed a migration rate of $37 \pm 9\%$ in 3% FBS/DMEM or of $36 \pm 14\%$ in 1% FBS/DMEM. Again, the migration of Cot-siRNAs cells was reduced to $11 \pm 5.2\%$ in 3% FBS/DMEM, and to $8 \pm 5\%$ in 1% FBS/DMEM (Fig. 2B). To determine if COX2 mediated the enhanced migration capacity of Cot-T cells, we performed migration assays in the presence of specific COX2 inhibitors. The addition of NS398 or Celecoxib to the wound healing assays inhibited Cot-T cells migration by about 60% (Fig. 2C). We also performed migration assays in the presence of PGE₂, one product resulting from COX2 activity that mediates its carcinogenic effects (16). PGE₂ did not further enhance the migration capacity of Cot-T cells, but increased of about 2 fold the migration rate of control cells, to the rate of Cot-T cells. Addition of PGE₂ did not increase Cot-siRNAs cell migration to the levels observed with Cot-T or even control cells. Distinctively, inhibition of Erk1/Erk2 activity of control and Cot-T cells, by the addition of UO126, drastically reduced their migration rate (Fig. 2C).

To investigate whether Cot regulates cell migration through changes in cell adhesion, we analyzed in Cot-T, control, and Cot-siRNAs cells, maintained for 20 h in 50% CM/DMEM, their adhesion capacity. Irrespective of the nature of the extracellular substrate Cot-T cells showed a 2-4 fold decrease in the number of adherent cells respect to control cells (Fig. 2D). However, only in fibronectin coated plates Cot-siRNAs cells showed a significant increase in the adhesion capacity (1.4 fold) respect to control cells. The capacity Cot-T cells preincubated

for the last 20 h in 1% or 3% FBS/DMEM to adhere to fibronectin or laminin was also significantly impaired (data not shown).

Cot regulates Rho-GTP and Rac-GTP levels. The Rho family regulates many facets of cytoskeletal organization (17). In Cot-siRNAs cells Rho-GTP levels are augmented 1.64 \pm 0.21 fold respect to control cells and could not be blocked by preincubation with PGE₂. Cot-T overexpression did not affect the Rho-GTP levels (Fig. 3A), but increased 2.07 \pm 0.39 fold Rac-GTP levels respect to the control. This increase was blocked by preincubation with Celecoxib. Nevertheless, the addition of PGE₂ to control cells increased Rac-GTP levels to the observed in Cot-T cells (Fig. 3B).

Cot modulates cytoskeletal reorganization. Cell migration requires the reorganization of the cytoskeleton. Cot-T cells displayed few actin stress fibres (Fig. 4A,B,C) and polarized microtubules throughout the cytoplasm (Fig. 4A), thus inducing lamellipodia formation (18). Cot-siRNAs cells developed abundant fibres (Fig. 4A,B,C) and perinuclear ring-like microtubules (Fig. 4A). Furthermore Cot-T cells, exhibited the largest number of ARP2/3 complexes (Fig. 4B), which are essential for the generation of lamellipodia (19). Paxillin immunostaining at the focal adhesion sites, which is concomitant with the ability to form strong focal adhesions (20), was clearly diminish in Cot-T cells respect to control or Cot-siRNAs cells (Fig. 4C). Western blot analysis also showed that Cot-T cells exhibit a 3-fold decrease in paxillin respect to control cells (Fig. 4C).

Cot modulates MMP-2 and MMP-9 activities. Cleavage of the extracellular matrix by MMPs is an essential step in tumour cell invasion (21). We detected increased pro-MMP-9

and pro-MMP-2 activity in Cot-T cells and decreased pro-MMP-9, pro-MMP-2, and MMP-2 activity in Cot-siRNAs cells respect to control cells (Fig. 5).

Discussion

Cot/tpl2 proto-oncogene is physiologically involved in immunity processes; here we show that Cot also regulates cell invasion and migration. A link between Cot overexpression and COX2 induction has been described in a T cell line and in EBV malignancies (22, 23) and it is also well established that increased COX2 and MMPs levels are essential for metastasis (15, 21). Our data show that non-physiological upregulation of Cot activity further enhances cell migration, which is achieved, at least partially, by the induction of COX2. Besides, our results indicate that endogenous Cot influence events involved in cell migration. This impaired cell migration is not due to decreased PGE₂ levels, since even in the presence of PGE₂ to Cot-siRNAs cells showed lower migration rate or increased Rho-GTP levels. As Erk1/Erk2 activity plays an essential role in cell migration and invasion (24) and PGE₂ did not increase Erk1/Erk2 phosphorylation in HeLa cells (data not shown), the low p-Erk1/Erk2 levels exhibited by Cot-siRNAs cells could be one reason of their impaired migration. In fact, inhibition of p-Erk1/Erk2 levels in control or Cot-T cell dramatically reduced their migration rate.

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) reduces the ability of cells to attach to different extracellular matrices, and PAI-1 induction is mediated by the Erk1/Erk2 and JNK pathways (25). Cot-T cells with higher pErk1/Erk2 and p-JNK levels showed higher PAI-1 protein levels than control or Cot-siRNAs cells (data not shown). Thereby, the modulation of cell adhesion by Cot-T could be mediated by PAI-1.

Cot-T cells have higher number of lamellipodia than control or Cot-siRNAs cells, and show fusiform, poorly spreading morphology which is characteristic of oncogenically transformed, thus agreeing with the higher Rac-GTP values observed (26). The morphological changes observed in Cot-siRNAs cells correlate with their low migration capacity. Excessive Rho activity inhibits migration via formation of strong focal adhesions and appearance of stress

fibres (27), this explains why Cot-siRNAs cells, that have increased Rho-GTP levels exhibited abundant stress fibres and displayed an impaired migration capacity.

Cot mutations are linked to cell malignancy. Here we show that non-physiological increased Cot activity enhances different steps involved in cell invasion. It is becoming clear that inflammatory and invasiveness processes share certain common molecular elements. Here we show also that endogenous Cot, which is involved in immunity processes, also regulates cell invasion. Proto-oncogenic Cot has been proposed as a very attractive target for the development of improved anti-inflammatory drugs and these data indicate that it could also be a target to block cell invasion.

Acknowledgements

We thank Drs. Iñiguez and Fresno for the p3x-Nf- κ B Luc. This work was supported by SAF 2005-00392 and “Fundación-Mutua-Madrileña” grants. LP is recipient of a FPU fellowship.

References

1. **Banerjee A, Gerondakis S.** Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol.* 2007 “in press”
2. **Miyoshi J, Higashi T, Mukai H, Ohuchi T, Kakunaga T.** Structure and transforming potential of the human cot oncogene encoding a putative protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1991; 11: 4088-96
3. **Gandara ML, Lopez P, Hernando R, Castano JG, Alemany S.** The COOH-terminal domain of wild-type Cot regulates its stability and kinase specific activity. *Mol Cell Biol.* 2003;23: 7377-90
4. **Patriotis C, Makris A, Bear SE, Tschlis PN.** Tumor progression locus 2 (Tpl-2) encodes a protein kinase involved in the progression of rodent T-cell lymphomas and in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 2251-5
5. **Erny KM, Peli J, Lambert JF, Muller V, Diggelmann H.** Involvement of the Tpl-2/cot oncogene in MMTV tumorigenesis. *Oncogene.* 1996; 13: 2015-20
6. **Babu G, Waterfield M, Chang M, Wu X, Sun SC.** Deregulated Activation of Oncoprotein Kinase Tpl2/Cot in HTLV-I-transformed T Cells. *J Biol Chem.* 2006; 281: 14041-7
7. **Clark AM, Reynolds SH, Anderson M, Wiest JS.** Mutational activation of the MAP3K8 protooncogene in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004; 41: 99-108
8. **Christoforidou AV, Papadaki HA, Margioris AN, Eliopoulos GD, Tsatsanis C.** Expression of the Tpl2/Cot oncogene in human T-cell neoplasias. *Mol Cancer.* 2004; 3: 34
9. **Sourvinos G, Tsatsanis C, Spandidos DA.** Overexpression of the Tpl-2/Cot oncogene in human breast cancer. *Oncogene.* 1999; 18: 4968-73
10. **Rodriguez C, Pozo M, Nieto E, Fernandez M, Alemany S.** TRAF6 and Src kinase activity regulates Cot activation by IL-1. *Cell Signal.* 2006; 18: 1376-85
11. **Ballester A, Tobena R, Lisbona C, Calvo V, Alemany S.** Cot kinase regulation of IL-2 production in Jurkat T cells. *J Immunol.* 1997; 159: 1613-8
12. **Jones JL, Royall JE, Critchley DR, Walker RA.** Modulation of myoepithelial-associated alpha6beta4 integrin in a breast cancer cell line alters invasive potential. *Exp Cell Res.* 1997; 235: 325-33
13. **Salmeron A, Ahmad TB, Carlile GW, Pappin D, Narsimhan RP, Ley SC.** Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *Embo J.* 1996; 15: 817-26
14. **Belich MP, Salmeron A, Johnston LH, Ley SC.** TPL-2 kinase regulates the proteolysis of the NF-kappaB-inhibitory protein NF-kappaB1 p105. *Nature.* 1999; 397: 363-8
15. **Sinicrope FA, Gill S.** Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23: 63-75
16. **Xu L, Han C, Wu T.** A novel positive feedback loop between PPARdelta and PGE2 signaling pathways for human cholangiocarcinoma cell growth. *J Biol Chem.* 2006; 281:33982-96
17. **Schwartz MA, Shattil SJ.** Signaling networks linking integrins and rho family GTPases. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25: 388-91
18. **Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K.** Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* 2005; 15: 76-83
19. **Pollard TD, Borisy GG.** Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003; 112: 453-65
20. **Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B.** Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 2003; 116: 4605-13

21. **Fingleton B.** Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci.* 2006; 11: 479-91
22. **Eliopoulos AG, Davies C, Blake SS, Murray P, Najafipour S, Tsihchlis PN, Young LS.** The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF-kappaB signaling downstream of TRAF2. *J Virol.* 2002; 76: 4567-79
23. **de Gregorio R, Iniguez MA, Fresno M, Alemany S.** Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J Biol Chem.* 2001; 276: 27003-9
24. **Reddy KB, Nabha SM, Atanaskova N.** Role of MAP kinase in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 2003; 22: 395-403
25. **Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B.** The ternary complex factor Net regulates cell migration through inhibition of PAI-1 expression. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 10853-62
26. **Riento K, Ridley AJ.** Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 446-56
27. **Ridley AJ.** Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001; 114: 2713-22

Figure 1

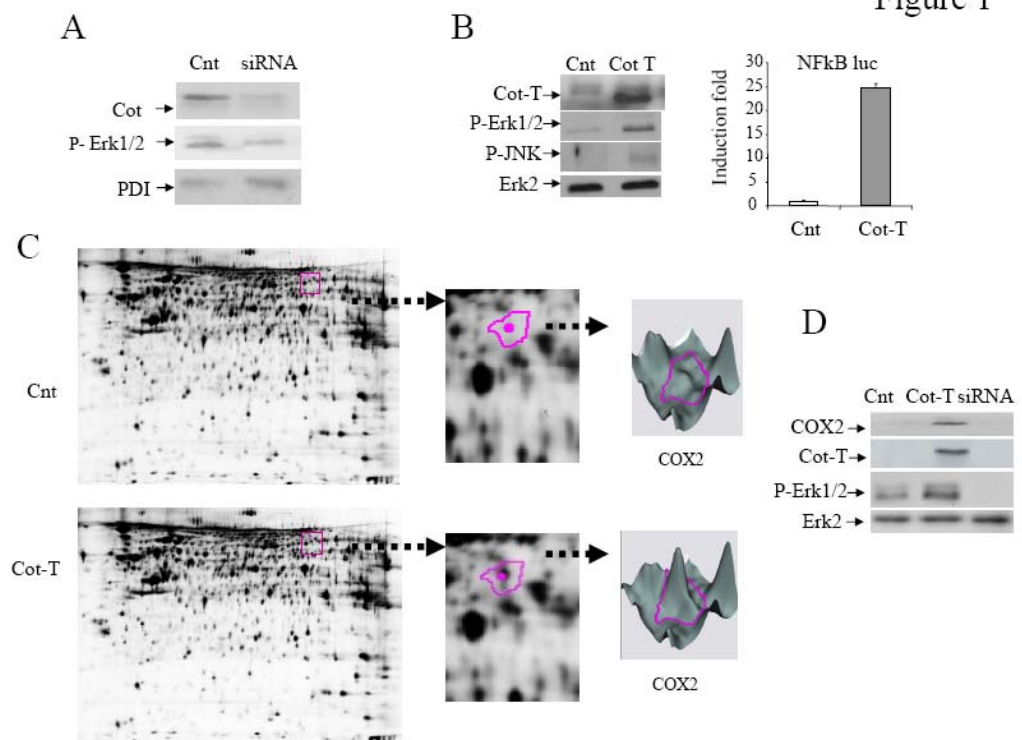


Figure 2

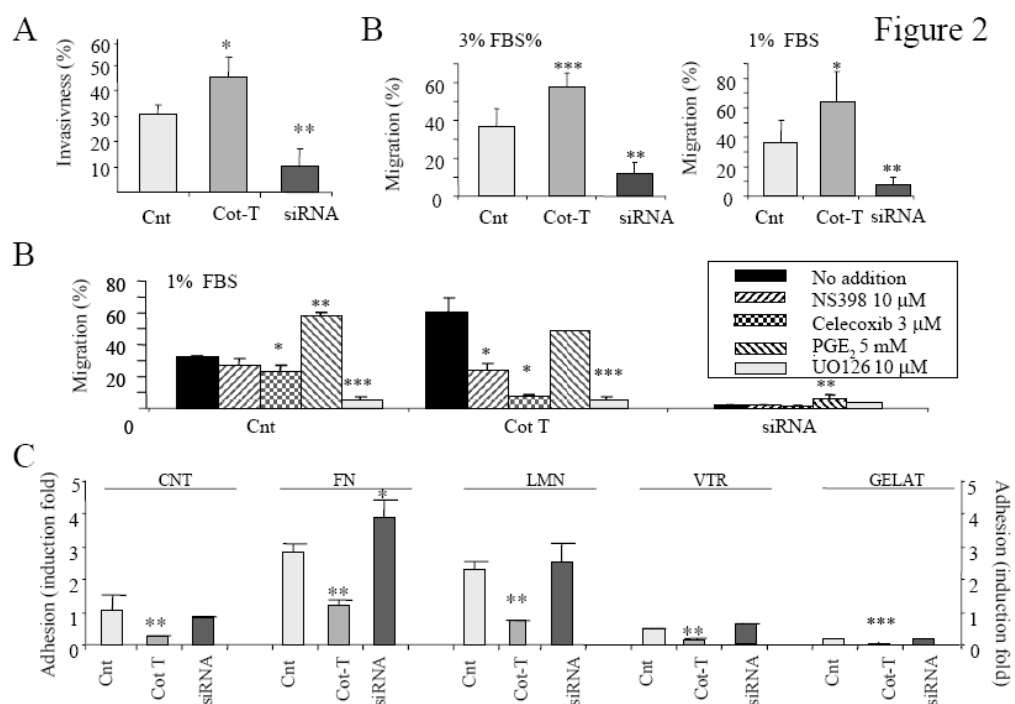


Figure 3

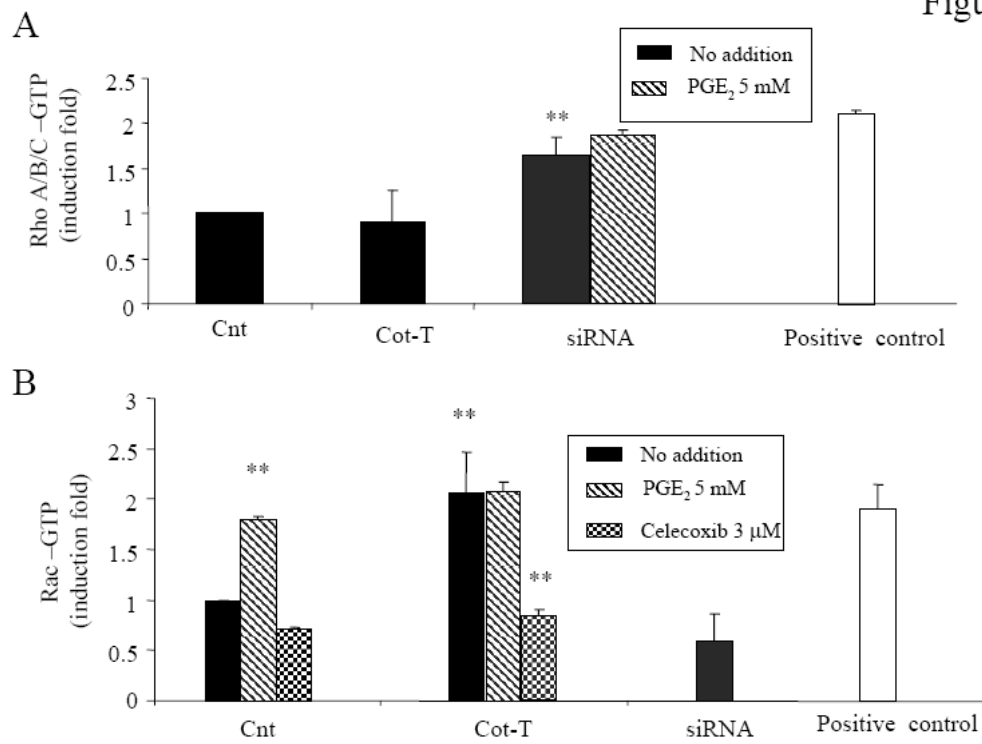


Figure 4A

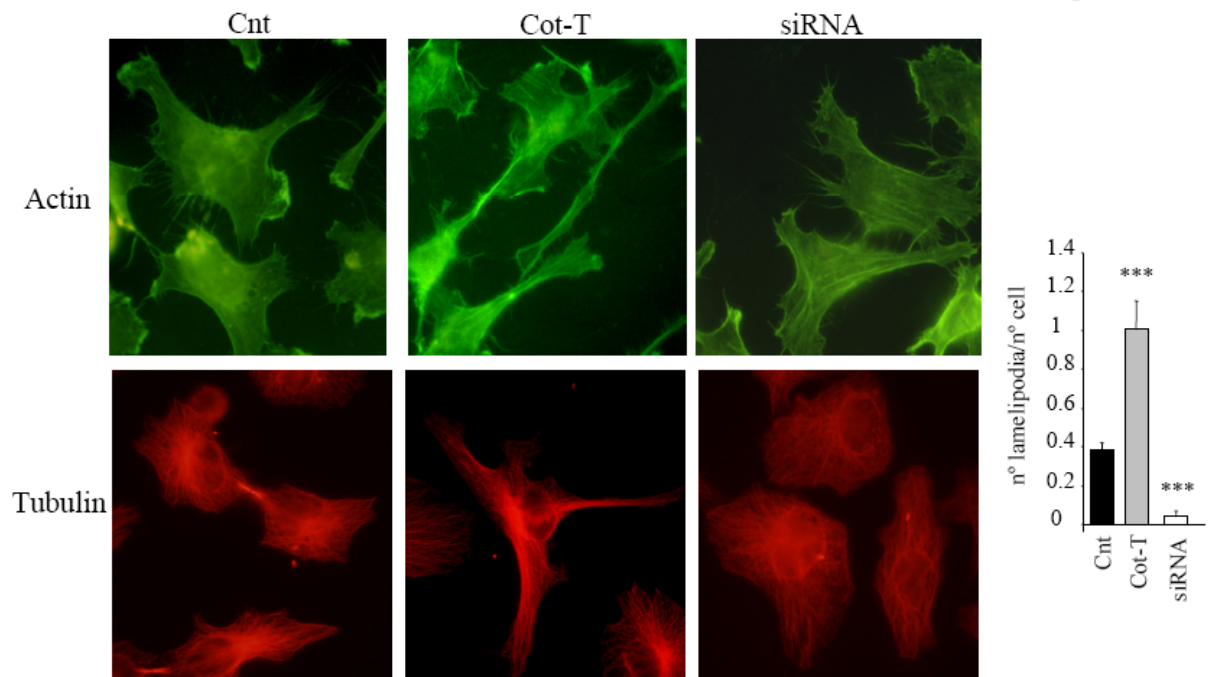


Figure 4B

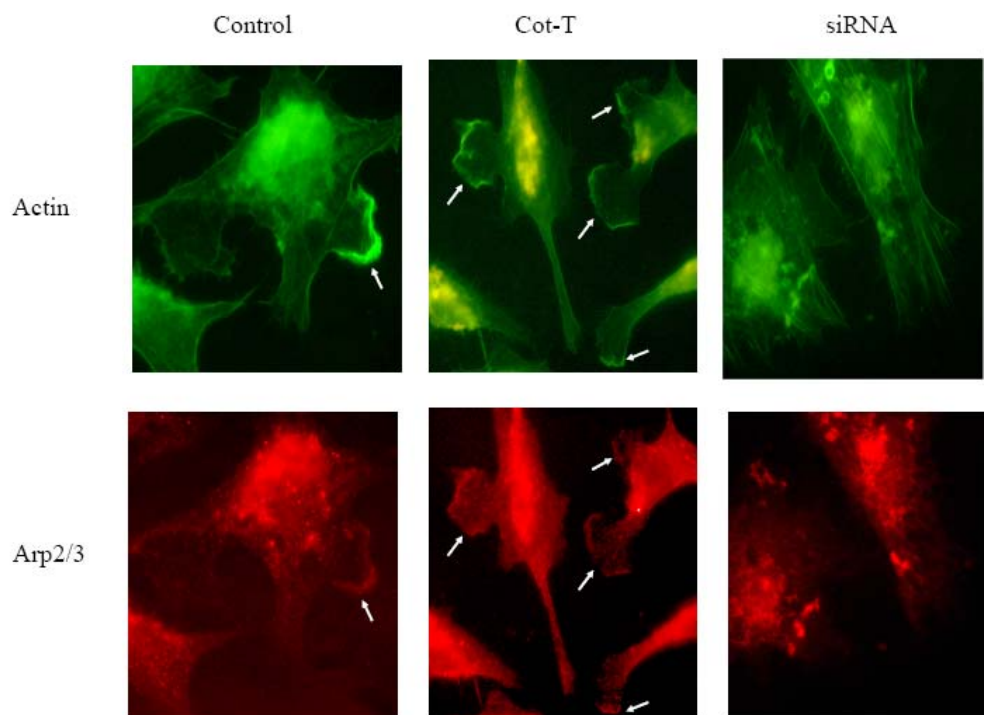


Figure 4C

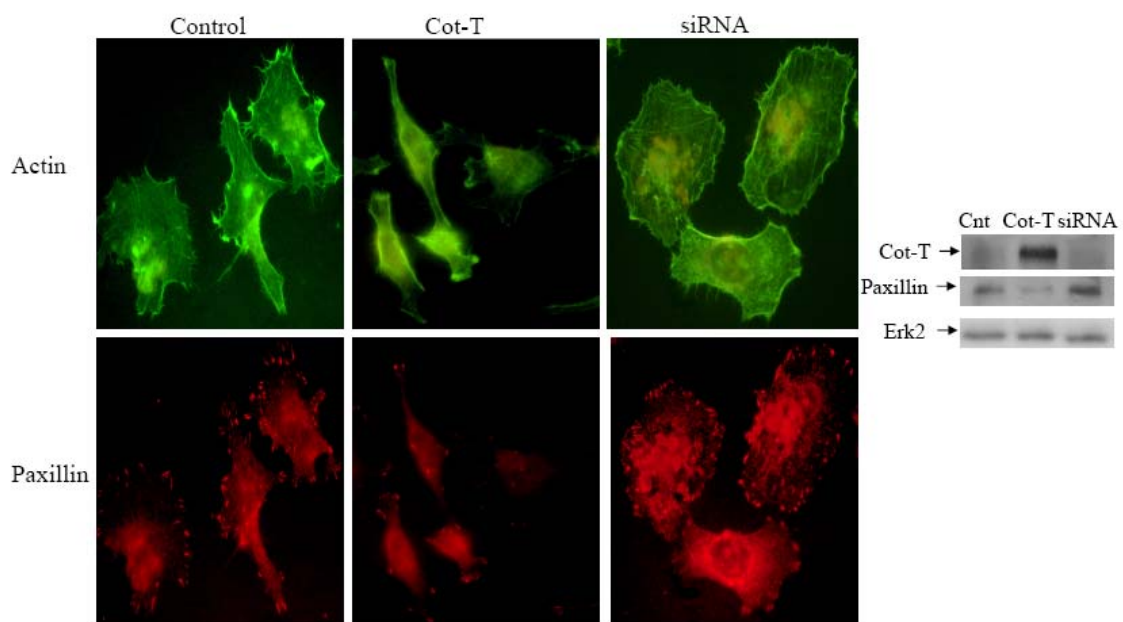


Figure 5

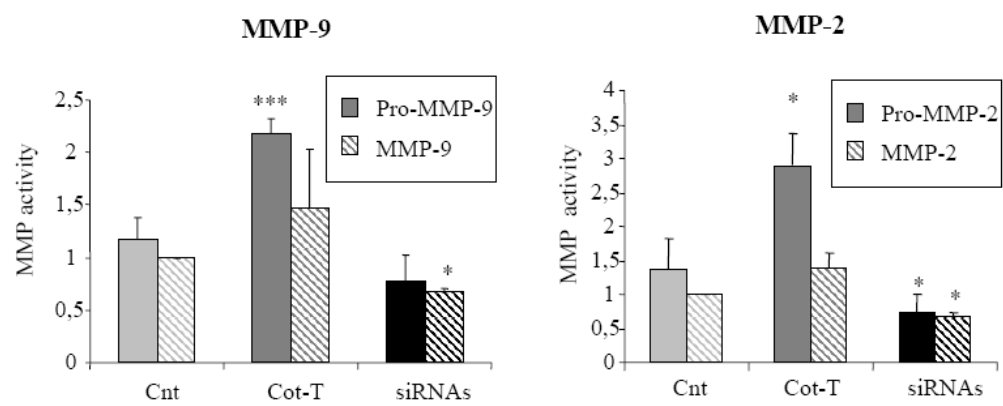


Figure Legends

Figure 1. Cot-T induces COX2 expression in HeLa cells. (A) Western blot of control or Cot-siRNAs cells probed with anti-Cot (Santa Cruz), anti-p-Erk1/Erk2, and anti-PDI antibodies. (B) Western blots of Cot-T and control cells probed with anti-Cot (Calbiochem), anti-p-Erk1/Erk2, anti-p-JNK, and anti-Erk2 antibodies. Luciferase activity represents the mean \pm SD of 3 measurements performed in triplicate. (C) 2D gel DIGE images separation and COX2 spot of control and Cot-T cells. (D) Western blot of COX2, Cot-T, p-Erk1/Erk2, and Erk2 of Cot-T, control, or Cot-siRNAs cells.

Figure 2. Cot regulates cell invasion, migration, and adhesion (A) The graph shows the mean \pm SD of the percentage of invasive cells respect to the total cells from 6 experiments performed in duplicate of control, Cot-T, and Cot-siRNAs cells. (B) The graphs show the mean \pm SD of 3 independent migration assays in 1% or 3% FBS/DMEM performed in triplicate of control, Cot-T, and Cot-siRNAs cells in the presence or absence of 10 μ M NS398, 3 μ M Celecoxib, 5 mM PGE₂, or 10 μ M UO126. (C) The figures show the mean \pm SD of three independent cell adhesion assays to fibronectin (10 μ g/ml, FN), vitronectin (0.3 μ g/ml, VTR), laminin (20 μ g/ml, LMN), or gelatin (10 μ g/ml, GELAT) performed in triplicate.

Figure 3. Cot regulates Rho A/B/C-GTP and Rac-GTP levels. The panels show the means \pm SD of 3 experiments performed in duplicate of Rho A/B/C-GTP (A) and Rac-GTP (B) levels in Cot-T, control, and Cot-siRNAs cells performed in the presence or absence of PGE₂ or Celcoxib; given value of 1 to control cells. Positive controls were provided by the kits.

Figure 4. Cot induces cytoskeletal reorganization. Cot-T, control, and Cot-siRNAs cells were stained with (A) phalloidin-FITC (1:200, Sigma) and anti- β -tubulin (1:200, Sigma), (B) phalloidin-FITC and anti-ARP 3(1:100, BD), (C) phalloidin-FITC and anti-paxillin (1:200, BD). (A) Lamellipodia from 10 fields of Cot-T, control, and Cot-siRNAs cells from 4 different experiments were counted and divided by the number of cells. (C) Western blot incubated with anti-Cot (Calbiochem), anti-paxillin, and anti-Erk2 antibodies. (A,B,C). Similar results were obtained with 4 different sets of transfected cells.

Figure 5. Regulation of MMP-2 and MMP-9 activities by Cot. Graphs show the mean \pm SD of 5 independent experiments of the pro-MMP-2, MMP-2, pro-MMP-9, and MMP-9 activity of Cot-T, control, and Cot-siRNAs cells. The value 1 corresponds to the MMP-2 and MMP-9 activity from control cells.